

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté de Science et Technologie

Département de Génie des Procédés



Spécialité de Pharmacie Industrielle

**Exploration des Propriétés pharmaceutiques et
microbiologiques des différents types de chitosane pour des
applications cutanées.**

Encadré par :

PR. LARIBI Hassiba

Présenté par :

Mlle. MALOUM Aya

Co-Promotrice :

Mlle. MEDJDOUB Ouafaa

Année universitaire

2024/2025

RESUME

Le chitosane, polysaccharide naturel dérivé de la chitine, suscite un intérêt croissant dans le domaine biomédical en raison de ses nombreuses propriétés biologiques. Ce mémoire s'intéresse à l'évaluation des propriétés pharmaceutiques et microbiologiques du chitosane dans le cadre d'applications cutanées, en s'appuyant sur des études in vitro et in vivo.

L'étude in vitro a permis de caractériser le chitosane du point de vue physico-chimique et de mettre en évidence son activité antibactérienne contre plusieurs souches pathogènes cutanées, notamment *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Par ailleurs, des formulations topiques à base de chitosane ont été développées et analysées pour leur stabilité, leur pH, leur viscosité et leur capacité de rétention sur la peau.

Les tests in vivo, réalisés sur modèle animal, ont démontré que le chitosane favorise la cicatrisation des plaies, réduit les signes d'inflammation et améliore l'intégrité cutanée. Aucune réaction indésirable notable n'a été observée, ce qui témoigne d'une bonne tolérance cutanée.

Ces résultats confirment que le chitosane constitue une alternative prometteuse pour la conception de traitements dermopharmaceutiques, en particulier dans la prise en charge des plaies infectées et des lésions superficielles. Ce travail ouvre la voie à des recherches complémentaires, notamment cliniques, pour valoriser pleinement le potentiel thérapeutique de cette biomolécule.

Mots-clés : chitosane, application cutanée, antimicrobien, cicatrisation, étude in vitro, étude in vivo.

ملخص

كيتوزان، وهو عبارة عن عديد سكاريد طبيعي مشتق من الكيتين، يحظى باهتمام متزايد في المجال الطبي الحيوي بسبب خصائصه البيولوجية العديدة. تركز هذه الأطروحة على تقييم الخصائص الصيدلانية والميكروبيولوجية للكيتوزان في سياق التطبيقات الجلدية، استنادًا إلى الدراسات المختبرية والحيوية.

سمحت الدراسة المختبرية بتوصيف الكيتوزان من وجهة نظر فيزيائية وكيميائية وتسلط الضوء على نشاطه المضاد للبكتيريا ضد العديد من السلالات المسببة للأمراض الجلدية، ولا سيما المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية. علاوة على ذلك، تم تطوير وتحليل تركيبات موضعية تعتمد على الشيتوزان للتأكد من ثباتها ودرجة الحموضة واللزوجة وقدرتها على الاحتفاظ على الجلد.

وقد أظهرت الاختبارات التي أجريت على نماذج حيوانية أن الكيتوزان يعزز التئام الجروح ويقلل من علامات الالتهاب ويحسن سلامة الجلد. لم يتم ملاحظة أي ردود فعل سلبية كبيرة، مما يشير إلى تحمل الجلد الجيد.

وتؤكد هذه النتائج أن الكيتوزان يعد بديلاً واعدًا لتصميم العلاجات الدوائية الجلدية، وخاصة في علاج الجروح المصابة والآفات السطحية. يفتح هذا العمل الطريق أمام الأبحاث التكميلية، وخاصة السريرية منها، لاستغلال الإمكانيات العلاجية لهذا الجزيء الحيوي بشكل كامل.

الكلمات المفتاحية: الكيتوزان، تطبيق الجلد، مضاد للميكروبات، التئام الجروح، دراسة في المختبر، دراسة في الجسم الحي .

ABSTRACT

Chitosan, a natural polysaccharide derived from chitin, is of increasing interest in the biomedical field due to its numerous biological properties. This thesis focuses on the evaluation of the pharmaceutical and microbiological properties of chitosan in the context of skin applications, based on in vitro and in vivo studies.

The in vitro study allowed to characterize chitosan from a physicochemical point of view and to highlight its antibacterial activity against several cutaneous pathogenic strains, notably *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Furthermore, topical formulations based on chitosan have been developed and analyzed for their stability, pH, viscosity, and retention capacity on the skin.

In vivo tests, carried out on animal models, have demonstrated that chitosan promotes wound healing, reduces signs of inflammation and improves skin integrity. No significant adverse reactions were observed, indicating good skin tolerance.

These results confirm that chitosan is a promising alternative for the design of dermopharmaceutical treatments, particularly in the management of infected wounds and superficial lesions. This work opens the way for complementary research, particularly clinical ones, to fully exploit the therapeutic potential of this biomolecule.

Key words: chitosan, skin application, antimicrobial, wound healing, in vitro study, in vivo study.

Remerciements

Avant toute chose, je rends grâce à Allah, le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la santé, la patience, la force et la persévérance nécessaires à l'accomplissement de ce travail. Sans Sa volonté et Sa guidance, rien n'aurait été possible.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice, **Pr. LARIBI HASSIBA**, pour ses conseils avisés et son accompagnement tout au long de ce mémoire. Sa confiance et ses encouragements ont été pour moi une source de motivation constante.

Mes remerciements les plus sincères vont également à ma Co-promotrice, Madame **MEDJDOUB OUAFAA**, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique, son soutien technique, ses remarques constructives et son encadrement bienveillant durant les différentes étapes de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon collègue de laboratoire, **KENZA BENACHOUR** pour son soutien constant, sa collaboration précieuse et sa bonne humeur tout au long de ce travail.

Je remercie chaleureusement **les membres du jury**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail, pour leurs lectures attentives, ainsi que pour leurs remarques pertinentes et enrichissantes.

Enfin, je dédie ce travail à **mes parents**. Merci à mon père et à ma mère, pour leur amour inconditionnel, leurs prières, leurs sacrifices et leur soutien indéfectible depuis toujours. Leur présence à mes côtés, dans les moments de doute comme dans les moments de réussite, m'a porté tout au long de ce parcours.

Qu'Allah récompense toutes ces personnes pour leur aide et leur bienveillance

Dédicace

Je dédie ce mémoire, fruit de plusieurs années d'efforts et de persévérance :

À mes chers parents, pour leur amour inconditionnel, leurs sacrifices et leur soutien sans faille.

Merci pour avoir toujours cru en moi.

À mes sœurs bien-aimées, Halima, Fatima Zahra, Houria, Maria et Sirin, pour leur présence, leur affection et leurs encouragements constants.

À mes tantes Djazia et Nadjia, pour leur tendresse, leurs prières et leur soutien moral précieux tout au long de mon parcours.

À ma grand-mère, piliers de sagesse et d'amour dans ma vie. Que Dieu vous accorde santé et paix.

A mon grand-père

À vous tous, je vous dis merci du fond du cœur. Ce travail est autant le vôtre que le mien.

Aya

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction

Partie I : Partie bibliographique

Chapitre I Généralités sur la chitosane

I.1	Définition et structure de chitosane	4
I.2	Les sources de chitosane.....	4
I.3	Procédés d'obtention du chitosane à partir de différentes sources (α , β , γ) :.....	5
I.3.1	Déminéralisation :	5
I.3.2	Déprotéinisation :	5
I.3.3	Blanchement :	6
I.3.4	Désacétylation :	6
I.4	Types de chitosane (α , β , γ) :	7
I.5	Facteurs influences la qualité de chitosane :	8
I.5.1	Degré de désacétylation :	8
I.5.2	Poids moléculaire	9
I.6	Propriétés du chitosane	9
I.6.1	Propriétés physico-chimiques :	9
I.6.2	Propriétés pharmaceutiques :	10
I.6.3	Propriétés microbiologiques :	11
I.7	Applications du chitosane dans le domaine biomédical et pharmaceutique	12
I.7.1	Cicatrisation :	12
I.7.2	Ingénierie tissulaire :	12
I.7.3	Administration de médicaments (topique, transdermique).....	12
I.8	Chitosane et applications cutanées :	13
I.8.1	Avantages du chitosane pour la peau :	13
	Formulations cutanées à base de chitosane :	14
I.8.2	Traitement de diverses affections cutanées :	14

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre II : Matériels et Méthode

II.1	Matériaux et Réactifs	18
II.2	Matières Premières de Chitosane	18
II.3	Réactifs et Produits Chimiques	18
II.3.1	Souches Microbiennes.....	20

II.3.2 Matériels pour les Tests Microbiologiques	21
• 2.3. Méthodes Expérimentales	21
II.4 Extraction du Chitosane (α , β)	21
II.4.1 Préparation des Matières Premières	21
II.4.2 . Déminéralisation	21
II.4.3 Déprotéinisation	22
II.4.4 Blanchiment	22
II.4.5 Désacétylation	22
II.5 Caractérisation Physico-chimique du Chitosane.....	22
II.5.1 . Détermination du Degré de Désacétylation (DDA) par Spectroscopie FTIR.....	22
II.5.2 Évaluation de la Solubilité	23
II.5.3 Caractérisation Rhéologique	23
II.5.4 Évaluation de l'Activité Antimicrobienne	24
II.5.5 Evaluation de l'Activité Antioxydant :	25
A _{échantillon} : absorbance d'échantillon.	25
A _{témoin} : absorbance de DPPH seul.....	26
II.5.6 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro :	26
II.5.7 Évaluation du Potentiel Hémolytique des Chitosanes.....	27
II.6 Études in vivo pour valider l'efficacité et la sécurité des applications cutanées :.....	28
II.6.1 -Rats Wister :.....	28
II.6.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire (in vivo) :.....	29
II.7 Cicatrisation :	31
II.7.1 Protocole de suivi visuel de cicatrisation par photographie.....	31
III. Résultats et interprétations.....	34
III.1 Caractérisation du chitosane :	34
III.1.1 Comparaison des caractéristiques physico-chimiques (DDA, solubilité, viscosité) des chitosane	34
Interprétation des Résultats	35
III.2 -résultats Observation Morphologique des Cristaux de Chitosane par Microscopie Optique	37
III.3 Évaluation de l'Activité Antimicrobienne.....	38
III.3.1 Activité antibactérienne :	38
III.3.2 Activité antifongique :	39
III.4 Présentation des résultats des tests d'activité antioxydant	41
III.4.1 Interprétation des Résultats du Test de Dénaturation de l'Albumine (Modèle in vitro d'activité anti-inflammatoire)	45
III.4.1 Présentation des résultats de l'évaluation du Potentiel Hémolytique des Chitosanes	46
III.4.2 Interprétation des Résultats d'Hémolyse.....	47
III.5 Résultats d'études in vivo pour valider l'efficacité et la sécurité des applications cutanées :	48
III.5.1 Activité anti-inflammatoire :	48
III.6 Résultats de cicatrisation	50
III.6.1 Interprétation Visuelle	50
Discussion :	51
Conclusion.....	55

Références Bibliographiques.....	56
---	-----------

Liste des figures

Figure I-1. Structures chimiques de la chitine et du chitosane.....	4
Figure I-2. Source de chitosane	5
Figure I-3. Etape d'extraction de chitosane.....	7
Figure I-4: Schéma simplifier des trios formes cristallines de chitosane.....	8
Figure II-1. Détermination de DDA par Spectroscopie FTIR.....	23
Figure II-2. Rats Wister.....	29
Figure II-3. Tourteaux agglomérés de l'aliment destiné aux rats.	29
Figure II-4. Applications de gel chitosane 2% de différents type.	30
Figure II-5. Injection de carraghénane au niveau de la patte gauche.	31
Figure II-6. Mesure de l'épaisseur de l'inflammation avec le pied à couliss.	31
Figure III-1. Spectre IR de defferentes types de chitosane	34
Figure III-5. Courbe de viscosité de defferentes types de chitosane	36
Figure III-9. Observation Morphologique des Cristaux des différents types de Chitosane par Microscopie Optique.	Erreur ! Signet non défini.
Figure III-10. Résultats de l'activité antibactérienne de différents types de chitosane.	38
Figure III-11. Résultats de l'activité antifongique de différents types de chitosane.....	39
Figure III-12. Pentas des Courbes d'Inhibition DPPH.	42
Figure III-13. Courbe de pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'œuf en fonction de la concentration de diclofenac(ug/ml)	44
Figure III-14. Courbe de pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'œuf en fonction de la concentration de Chitosane (ug/ml).....	45
Figure III-15. Courbe dose-réponse.....	47

Liste des tableaux

Tableau I-1: Type de chitosane .	8
Tableau II-1. Réactifs et produits chimiques utilisés pour l'extraction et la caractérisation du chitosane.	19
Tableau II-2. Appariels utilisée.	20
Tableau III-1: Détermination degré désacétylation.	34
Tableau III-2. Test de solubilité de chitosane.	35
Tableau III-3. Viscosité de defferentes types de chitosane de defferentes vitesse de cisiallement	35
Tableau III-4. Diamètre d'inhibition de quelques souches bactériennes.	39
Tableau III-5. Diamètre d'inhibition de souche fongique.	39
Tableau III-6. Des résultats des tests d'activité antioxydant.	41
Tableau III-7. Résultats des antioxydants standard.	41
Tableau III-8: Résultats calculées par régression linéaire sur la plage linéaire.	42
Tableau III-9. Test de dénaturation de l'albumine d'œuf.	43
Tableau III-10. Test de dénaturation de l'albumine d'œuf de declofinac	43
Tableau III-11. Classement par Efficacité (IC_{50})	45
Tableau III-12: Résultats du Potentiel Hémolitique	46
Tableau III-13. Calcul des HC_{50} (Concentration Hémolitique Médiane). Erreur ! Signet non défini.	
Tableau III-14. Seuils Clés d'Hémolyse	47
Tableau III-15. Résultats anti-inflammatoire	43
Tableau III-16. Résultats d'augmentation relative de l'œdème	48
Tableau III-17. Résultats de cicatrisation.	50
Tableau III-18. Classification Fondée sur des Preuves	53

Liste des abréviations

- **%** : Pourcentage
- **cm** : Centimètre
- **DDA** : Degré de Déacétylation
- **FTIR** : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
- **g/j.kg** : Grammes par jour et par kilogramme
- **h** : Heure(s)
- **kg** : Kilogramme
- **M** : Molaire (concentration molaire)
- **mg** : Milligramme
- **microgramme/ml** : Microgramme par millilitre ($\mu\text{g/ml}$)
- **min** : Minute(s)
- **ml** : Millilitre
- **mm** : Millimètre
- **nm** : Nanomètre
- **pH** : Potentiel Hydrogène
- **pKa** : Constante de dissociation acide
- **PM** : Poids Moléculaire
- **tr/min** : Tours par minute
- **UV** : Ultraviolet

Introduction

Introduction

Les polymères, en raison de à leur diversité structurale, biocompatibilité et capacité de modification chimique pour correspondre à des besoins spécifiques, jouent un rôle essentiel dans le secteur biomédical et cosmétique. Dans le domaine biomédical, ils sont utilisés comme matériaux pour la diffusion contrôlée de médicaments, les prothèses, les pansements et les systèmes de distribution ciblée. Dans l'industrie cosmétique, ils occupent également un rôle indispensable, notamment en tant qu'agents créant un film, épaississants, hydratants ou porteurs d'actifs [1].

Le chitosane, un polymère cationique dérivé de la chitine, fait l'objet d'un intérêt croissant parmi les polymères naturels les plus étudiés ces dernières années. Le chitosane, avec ses caractéristiques uniques comme la biocompatibilité, la biodégradabilité, la non-toxicité de toxicité, ainsi que ses propriétés antimicrobiennes et cicatrisantes, se présente comme un candidat prometteur pour des applications cutanées, aussi en cosmétique. [2][3].

Cependant, malgré les avancées dans la recherche, l'utilisation du chitosane dans les formulations cutanées reste encore limitée, principalement en raison de la variabilité de ses propriétés en fonction de son degré de désacétylation, sa masse moléculaire, et son mode de préparation. Ces paramètres ont un effet considérable sur sa capacité à solubilité, sa viscosité, son pouvoir filmogène, ainsi que son efficacité antimicrobienne et sa compétence à interagir avec la peau ou d'autres compositions actives. [4].

Problématique : Nécessité d'explorer le potentiel du chitosane pour des applications cutanées spécifiques.

Ce travail vise à : Caractériser différents types de chitosane selon leur degré de désacétylation, leur poids moléculaire et leur origine ; Évaluer leurs propriétés pharmaceutiques et microbiologiques, notamment leur activité antimicrobienne, leur biocompatibilité et leur capacité ,Étudier leurs applications cutanées, à travers des essais in vitro ou in vivo.

Partie 01

Etude Bibliographique

Chapitre I

I.1 Définition et structure de chitosane

Le chitosane, obtenu par désacétylation de la chitine, a été identifié par Rouget en 1859[5]. Ce dernier a observé que la chitine chauffée en présence de potasse devenait soluble dans des solutions aqueuses acides [6]. Bien que le chitosane soit peu courant dans la nature, il se retrouve dans la cuticule de certains insectes, dans le mycélium de champignons microscopiques appelés zygomycètes, ainsi que chez certaines algues (notamment *Chlorella* sp.), protozoaires, bactéries et levures. [7]

La structure chimique du chitosane est très proche de celle de la chitine et de la cellulose, Le chitosane est un copolymère linéaire et flexible constitué de 2-acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranose et de 2-amino-2-désoxy- β -D-glucopyranose, reliés entre eux par des liaisons β (1-4). C'est un polysaccharide similaire à la cellulose. [8] (Figure 1)

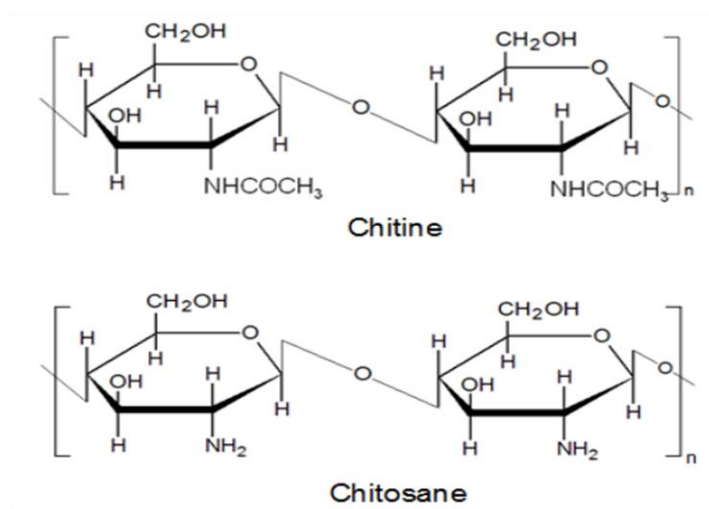


Figure I-0-1.Structures chimiques de la chitine et du chitosane.

I.2 Les sources de chitosane

La chitine est présente dans de nombreuses sources à travers le monde, avec une diversité remarquable. Les arthropodes — comprenant crustacés, insectes et arachnides, qui totalisent plus d'un million d'espèces — constituent une source majeure et abondante de ce polymère naturel [9]. On trouve la chitine dans les carapaces de crevettes, homards, crabes, langoustines, ainsi que dans certains insectes comme les blattes et les fourmis, mais aussi dans les parois cellulaires des algues, des levures et des champignons [10].

La proportion de chitine varie selon les organismes, allant de 7 % chez la balane (*Lepas anatifera*) à 36 % chez l'écrevisse (*Astacus fluviatilis*). Chez les céphalopodes, l'os de seiche (*Sepia officinalis*) contient environ 20 % de chitine β , tandis que le calamar (*Loligo vulgaris*) en renferme 40 % [11]. Chez les mollusques bivalves, la chitine α s'associe aux protéines pour former un complexe structuré, organisé précisément le long de l'axe et sur les bords de la coquille. Ce polymère joue un rôle crucial dans la résistance mécanique, en intégrant les zones flexibles et en orchestrant les modifications lors de la formation de la coquille [8].

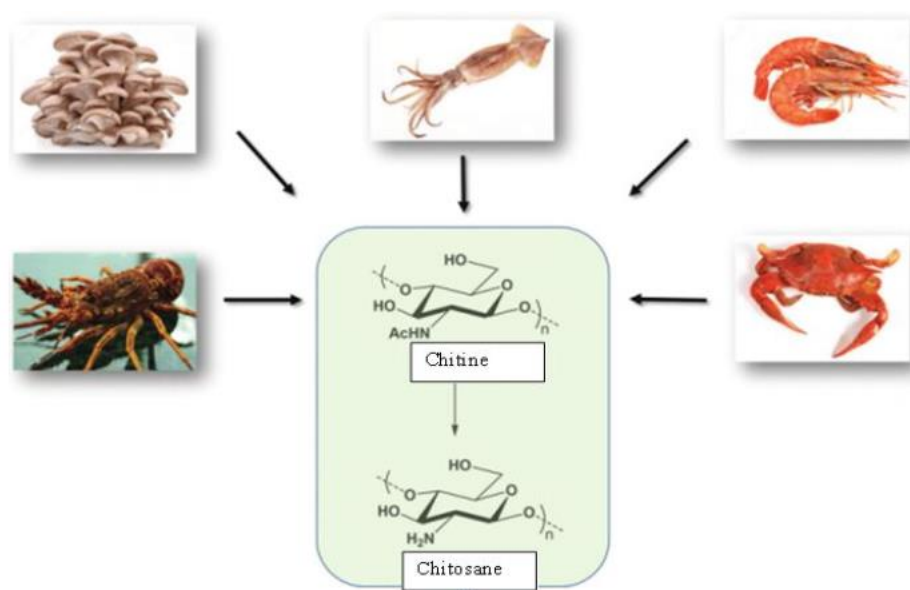


Figure 0-2.Source de chitosane[8]

I.3 Procédés d'obtention du chitosane à partir de différentes sources (α , β , γ) :

I.3.1 Déminéralisation :

L'élimination des minéraux par voie acide se fait en les transformant en sels à l'état de solution. Sur le plan industriel, les acides couramment utilisés pour la déminéralisation incluent l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, l'acide sulfurique et l'acide éthylène-diaminetétra-acétique (EDTA) [12,13]. Pour des motifs économiques, on privilégie l'utilisation de l'acide hydrochlorique (HCl).

I.3.2 Déprotéinisation :

La structure des cuticules des crustacés repose sur une forte liaison entre les protéines et la chitine, ce qui rend leur séparation difficile. Pour enlever les protéines, on utilise un traitement basique qui les dissout. Cependant, l'hydroxyde de sodium (NaOH) est plus largement utilisé en

raison de son faible coût. Les concentrations de ces bases varient généralement de 0,3 à 2,5 M, avec un rapport de 1:10 à 1:40, à des températures de 50 à 110 °C, pendant 1 à 24 heures.(10,14) La durée du traitement est inversement proportionnelle à la température.

L'augmentation de la concentration, de la température et de la durée du traitement améliore l'élimination des protéines lors de la déprotéinisation. Autrement dit, plus ces paramètres sont élevés, plus la séparation des protéines est efficace [15].

I.3.3 Blanchiment :

Cette étape n'est pas obligatoire car la teinte de la chitine ne semble pas influencer la structure du chitosane, mais simplement produire un effet de décoloration du produit à des fins commerciales. Toutefois, l'obtention d'un produit pur est extrêmement complexe en raison des interactions intenses entre la chitine, les pigments et les protéines.

Le blanchiment est généralement réalisé par l'utilisation d'agents oxydants tels que le KMnO_4 , le NaOCl , le SO_2 , le NaHSO_3 , le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ou le H_2O_2 . Cette technique peut supprimer les résidus de pigments, tels que les caroténoïdes. Au cours du processus de décoloration, l'agent employé ne doit pas impacter aux propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane. Généralement, l'agent de blanchiment employé est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), dont la concentration est comprise entre 0,1 et 33 %. Il peut également être mélangé avec HCl . La durée du traitement est souvent de l'ordre de quelques minutes [16].

I.3.4 Désacétylation :

On fabrique le chitosane en modifiant la chitine par un processus appelé désacétylation, qui consiste à éliminer certains éléments chimiques. Grâce à cette transformation, le chitosane se dissout facilement dans de l'acide acétique à 5 %. Il existe deux méthodes principales pour fabriquer le chitosane :

La première, décrite par Broussignac[17], utilise un mélange composé de 50 % de KOH , 25 % d'éthanol et 25 % de monoéthylèneglycol. La chitine est ajoutée petit à petit tout en augmentant progressivement la température. Une fois la réaction terminée, le mélange est filtré et le chitosane obtenu est rincé à l'eau pour être neutralisé.

La deuxième méthode, proposée par Kurita et ses collègues [18], consiste à chauffer une suspension de chitine (500 mg dans 30 ml de NaOH à 50 %) sous un courant d'azote tout en agitant. Le produit solide est ensuite filtré, puis lavé à l'eau distillée jusqu'à pH neutre. Il est

ensuite rincé avec du méthanol, puis avec de l'acétone. Enfin, le chitosane est séché pendant 12 heures à 50 °C.

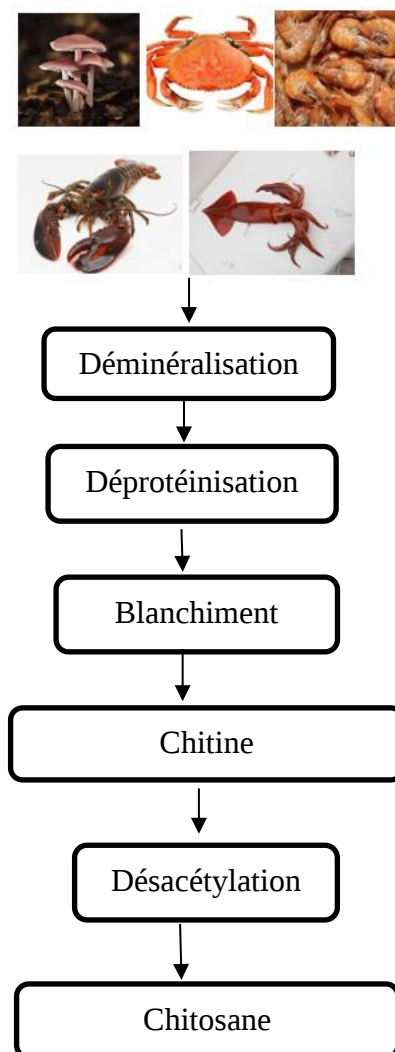


Figure I-0-3. Etape d'extraction de chitosane.

I.4 Types de chitosane (α , β , γ) :

Le chitosane est le dérivé de la chitine par désacétylation, existe sous trois formes cristallines principales : alpha, bêta et gamma. Ces formes diffèrent selon la façon dont les chaînes de sucres sont arrangées, ce qui influence leurs propriétés physiques et chimique

Alpha (α) : Les chaînes sont disposées de manière antiparallèle, ce qui confère à cette forme une grande stabilité et une structure cristalline compacte, et de faibles solubilités

Bêta (β) : Les chaînes sont parallèles et alignées dans la même direction, ce qui rend cette forme plus flexible et hydratée. Sa solubilité est élevée.

Gamma (γ) : Il s'agit d'une forme mixte, combinant des caractéristiques des formes α et β , avec des couches parallèles et antiparallèles (Hybride). Cette forme est moins courante et présente des propriétés intermédiaires.

Tableau I-0-1: Type de chitosane [19].

Type	Source principale	Structure	Solubilité	Applications clés
Alpha α	Crabe, crevette	Antiparallèles	Faible	Films, biomatériaux
Beta β	Plume de calamar	Parallèles	Elevée	Pharmaceutique, cosmétique
Gamma γ	Insectes, champignons	Hybride	Moyenne	Biocapteurs, matériaux innovants

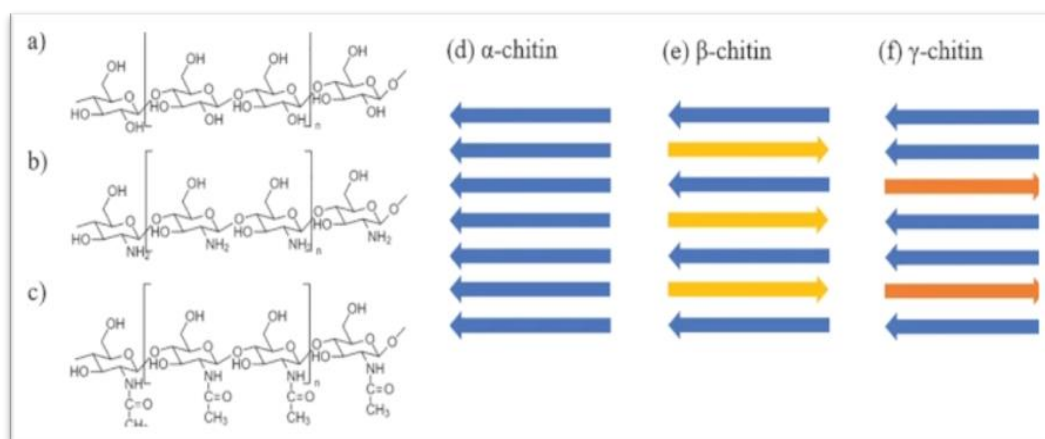


Figure 0-4: Schéma simplifié des trois formes cristallines de chitosane [20].

I.5 Facteurs influençant la qualité de chitosane :

I.5.1 Degré de désacétylation :

Le degré de désacétylation (DDA) est essentiel pour comprendre ce qu'est le chitosane. En fait, le chitosane est obtenu en enlevant des groupes appelés acétyles de la chitine, grâce à un processus appelé déacétylation. La chitine et le chitosane ont une structure chimique très similaire, composée de deux types d'unités : la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et la glucosamine (GlcN). La différence entre ces deux polymères vient de la proportion de ces unités, ce qu'on appelle le DDA. Comme la déacétylation n'est jamais complète, le chitosane est en fait

une forme partiellement modifiée de la chitine. En général, si plus de 50 % des unités sont des GlcNAc, on parle de chitine, et si c'est moins de 50 %, on parle de chitosane [2,21,22]

I.5.2 Poids moléculaire

Le deuxième facteur essentiel est le poids moléculaire (PM), qu'il soit en valeur de masse ou de nombre, ou optimalement la distribution de poids moléculaires [23]. La valeur du poids moléculaire d'un chitosane fortement affectée par le procédure de fabrication car celui-ci peut faciliter une dépolymérisation des chaînes macromoléculaires et/ou une décomposition au cours sa production. Les chaînes de chitosane présentent une grande diversité de masses, allant de 100 à 1000 kDa, en fonction des applications ciblée. [24]

I.6 Propriétés du chitosane

I.6.1 Propriétés physico-chimiques :

I.6.1.1 Solubilité :

Le chitosane est généralement contrôlé par le pH qui contrôle sa solubilité. Le pKa moyen des amines existant sur le chitosane est de 6,3 [25]. Ainsi, même si que le pH est plus bas à pKa, le chitosane se décompose, mais à contraire, sa réduction ne sera pas possible si le pH est élevé à pKa. De plus, la forme des chaînes de polymère en solution est modifiée par le pH et le DDA. Ces deux paramètres fixent la densité de charge pendant de la chaîne polymère. Lorsque celle-ci est grande, les chaînes polymères sont grandement étirées et à Par contre en cas de le polymère est peu chargé, ces chaînes s'affichent sous la forme de pelotes statistiques [26]. À des concentrations faibles, le chitosane peut se dissoudre dans des mélanges d'H₂O acide et de l'alcool [27].

I.6.1.2 Viscosité :

La viscosité du chitosane dépend du degré d'acétylation de ce polymère. Plus sa désacétylation est avancée, plus il se forme des groupements amines libres et plus le chitosane devient soluble, ce qui induit un développement de sa viscosité [28]. La viscosité est aussi contrôlée par la concentration du polymère (qui tend à s'élever avec la concentration), la température (qui a façon à diminuer avec une hausse de température) [29], le poids moléculaire (qui voit sa viscosité intrinsèque se renforcer proportionnellement à l'augmentation du poids moléculaire) [30] et finalement le pH (plus ce dernier est bas, plus la viscosité s'intensifie). Il y a différents procédés pour mesurer la viscosité. L'appareil le plus couramment utilisé est « le viscosimètre ». Elle

nécessite une compréhension des paramètres K et a de la relation de Mark-Houwink Sakurada [31].

$$[\eta] = K.M^a$$

Où :

$[\eta]$: viscosité intrinsèque.

M : Poids moléculaire moyen.

a et K : constantes pour un système solvant/soluté donné.

I.6.2 Propriétés pharmaceutiques :

I.6.2.1 Biocompatibilité :

Le chitosane est certifié biocompatible, car son interaction avec les tissus et cellules des êtres vivants provoque une réaction inflammatoire et de rejet minimale. Les caractéristiques immunologiques du chitosane sont très restreintes, car il est identifié par les organismes comme une composante de soi-même, un élément non étranger, non immunogène et dépourvu de potentiel antigénique. Ainsi, le chitosane est très bien accepté par les tissus vivants, y compris l'épiderme, les tissus osseux, l'épithélium nasal, les membranes de l'œil, ainsi que les systèmes neurologique, respiratoire, cardiovasculaire, hépatique, urinaire, digestif et génétique (ADN) [32,33,34,35]. En effet, il se résorbe naturellement avec des cinétiques maîtrisées [5,36]

I.6.2.2 Biodégradabilité :

La biodégradabilité exige constamment une étape première de bio fragmentation du matériau en petites molécules que les cellules microbiennes possèdent retenir, pour qu'elles puissent par la suite être décomposées en eau, dioxyde de carbone, méthane, composés non organiques et biomasse. Alors que certaines espèces microbiennes, y inclus quelques types de champignons et de bactéries, sont classées pour leur production de chitosane, il est naturel que ces microorganismes soient aussi en mesure de le dégrader. Ils possèdent des mécanismes de reconnaissance propre et disposent donc des enzymes requises pour sa synthèse et sa décomposition. [37,38]

De plus, le chitosane est également résistant à l'hydrolyse acide et à la décomposition oxydo-réductrice. En tant que matériau biodégradable, le défi principal lié au chitosane est de créer des systèmes stables qui garantissent une utilisation optimale initialement, suivie d'une décomposition complète jusqu'à intégration totale à la fin du cycle de vie du produit.

I.6.2.3 Non-toxicité :

Le chitosane est reconnu pour sa non-toxicité et sa faible cytotoxicité a été prouvée par multiples études cliniques, et aussi in vitro que dans le vivo sur des organismes vivants et des patients humains. Cette propriété autorise l'usage du chitosane dans divers domaines, de l'industrie alimentaire à la industrie pharmaceutique, en compris le biomédical, ce qui justifie la grande polyvalence de ce biopolymère. Une recherche effectuée sur des sujets humains concernant l'impact chélatant sur les lipides suite à l'ingestion orale de 4,5 g/jour de chitosane (DDA et PM non spécifiés) a mis en évidence l'absence totale de toxicité ou d'effets secondaires indésirables [39,40]. Un essai présente qu'aucune toxicité n'est remarquée suite à l'administration orale de chitosane à 100 mg/kg (80 kDa, 80% DDA) chez les souris. D'après d'autres analyses, l'administration orale et intraveineuse de doses de chitosane de 1 g/jour. Kg et 4.5 g/jour. Kg serait sans danger, comme l'indiquent les études menées sur les lapins et les poulets respectivement [5].

I.6.3 Propriétés microbiologiques :

I.6.3.1 Activité antibactérienne :

la propriété antimicrobienne du chitosane et de ses dérivés est bien validée, plusieurs études montrant mis en évidence leur potentiel antimicrobien à la fois in vitro et in situ (sur des aliments réels et des tissus biologiques). Néanmoins, la plupart des essais rédigées se concentrent sur les solutions et films à base de chitosane [41,42,43,44,48]. Le chitosane est donc doté d'une efficace activité antimicrobienne contre une vaste gamme de souches bactériennes, fongiques et même des levures, virus et spores. On l'attribue à ses propriétés antibactériennes, et plus d'abord à sa capacité à agir contre un large champ de bactéries Gram-positives et Gram-négatives.

I.6.3.2 Activité antifongique :

Il est essentiel de considérer que le chitosane influence sur les champignons par le mode d'interactions électrostatiques en surface, de chélation via des métaux tel que le magnésium ou le calcium et de mécanismes intracellulaires. Il se trouve des catégories de champignons qui montrent une sensibilité minimale au chitosane. Les champignons qui répondent au chitosane ont une membrane hautement fluide, riche en acides gras libres polyinsaturés, alors que les membranes qui résistent au chitosane sont de faible fluidité et abondent en acides gras libres saturés [49,50].

I.6.3.3 Activité antioxydante :

L'une des propriétés les plus identifiées du chitosane est son activité antioxydante. De nombreuses études ont établi que le chitosane perturbe les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et empêche l'oxydation des lipides dans les aliments et certains systèmes biologiques. On a proposé plusieurs mécanismes afin d'indiquer l'action antioxydant du chitosane. Le chitosane a la compétence de capter les radicaux libres ou de créer des compositions via les ions métalliques de la source d'hydrogène ou des couples d'électrons isolés. L'interaction au sein le chitosane et les ions métalliques pourrait intégrer multiples actions complexes, compris lesquelles l'adsorption, l'échange d'ions et la chélation. [50]

I.7 Applications du chitosane dans le domaine biomédical et pharmaceutique

I.7.1 Cicatrisation :

La peau a une responsabilité majeure lors de la protéger du corps contre les attaques extérieures. Toute blessure, même de moindre valeur, besoin une action pour stopper l'hémorragie, éviter les infections et aider à la guérison [51].

Le processus de cicatrisation des plaies est complexe et change d'un organisme à l'autre, incluant la réparation des blessures et la régénération des tissus. La cicatrisation implique divers types de cellules, des messagers intracellulaires et des molécules régulées par les facteurs de croissance ainsi que les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules inflammatoires [51]

I.7.2 Ingénierie tissulaire :

Dans le cadre de l'ingénierie des tissus, les analyses se concentrent actuellement sur l'usage de vecteurs poreux non viraux tels que les matrices de chitosane modifié pour la reconstitution tissulaire. Le chitosane et ses dérivés, récemment décrits comme de bons candidats pour la réparation du cartilage, se décomposés de façon à ne pas nécessiter d'inflammation ou de résidus lors de cette dégradation pendant la création de nouveaux tissus. [52,53]

I.7.3 Administration de médicaments (topique, transdermique)

Actuellement, l'essentiel champ de recherche sur le chitosane se concentre sur son application dans l'administration de médicaments. De nombreuses revues de littérature sur ce thème ont vu le jour au cours des années [54]. Pour cette application, certaines caractéristiques du chitosane sont particulièrement attrayantes. Il possède effectivement la faculté de booster l'absorption au niveau des muqueuses en dilatant temporairement les jonctions entre les cellules épithéliales, et grâce à sa nature bioadhésive, il prolonge la durée de contact entre le véhicule et les tissus [55].

I.8 Chitosane et applications cutanées :**I.8.1 Avantages du chitosane pour la peau :****I.8.1.1 Hydratation :**

Le chitosane est une substance adaptable, principalement appliqué dans les produits cosmétiques pour ses propriétés hydratantes, calmantes et réparatrice. Il aide à maintenir l'hydratation de la peau en permettant à retenir l'eau entre les zones supérieures de celle-ci. Il a tout aussi une compétence filmogène, ce qui signifie qu'il crée un film sur la peau qui aide à constituer une barrière protectrice pour prévenir la perte d'eau par mode transépidermique (TEWL), et protège aussi la peau contre les agressions extérieures telles que la pollution et les rayons UV. [56]

I.8.1.2 Protection :

En raison de ses diverses caractéristiques, le chitosane effectue le rôle d'un agent multifonctionnel de protection pour la peau : Il remplit de rempart contre la déshydratation et les composés polluantes en formant une film semi-perméable protégeant sur la peau, ce qui réduit la perte d'eau par les couches cutanées (TEWL) et garantit une défense contre les particules de du milieu (pollution, poussières).[57]Le chitosane est capable de identifier les radicaux libres et de minimiser les blessures causés par les rayons UV, apportant ainsi une protection contre le vieillissement prématuré de la peau..[58]

I.8.1.3 Régénération :

Le chitosane, un actif régénérateur puissant, accélère la guérison des plaies en facilitant à la fois la migration des kératinocytes (cellules de l'épiderme) et la croissance des fibroblastes (synthèse du collagène), diminuant ainsi l'inflammation. Par ailleurs, il favorise une augmentation de la production de collagène de type I et III, renforçant en conséquence la fermeté et l'élasticité de la peau. Le chitosane, par ses propriétés anti-inflammatoires et antiseptiques, élimine les cicatrices hypertrophiques et favorise à une peau plus homogène liée à une lésion. [57]

Formulations cutanées à base de chitosane :**I.8.1.4 Crèmes :**

Les crèmes à base de chitosane sont des systèmes d'administration topique (émulsions huile-dans-eau ou eau-dans-huile) incorporant du chitosane comme :
Ingrédient actif : pour ses propriétés biologiques (cicatrisation, antibactérien) , ou comme un excipient fonctionnel : comme agent épaississant, filmogène ou vecteur d'actifs. il y a plusieurs types de crème à base de chitosane par exemple : Crème hydratante, Crème cicatrisante. [57] [59]

I.8.2.2 Gels :

Les gels à base de chitosane sont des systèmes semi-solides, qu'ils soient hydrophiles ou hydrophobes, qui s'identifient par un mécanisme tridimensionnel de chitosane (polysaccharide cationique). Ils sont caractérisés par : l'état rhéologique, le mécanisme de gélification physique (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques) et chimique (réticulation avec du glutaraldéhyde, genipine), ainsi que la teneur en chitosane. [5]

I.8.2.3 Pansements :

Les pansements composés du chitosane sont des dispositifs médicaux non tissés ou hydrogels structurés autour d'une matrice principale à base de chitosane. Selon l'Association Européenne de Gestion des Plaies (EWMA), ils sont répartis en trois catégories : Films (d'une épaisseur de 20 à 100 µm), hydrogels (contenant plus de 90% d'eau), et éponges (avec une porosité élevée à 80%). Ces caractéristiques comprennent la transformation hémotase, la cicatrisation et la barrière microbienne. [60]

I.8.2 Traitement de diverses affections cutanées :**I.8.2.1 Acné :**

Le chitosane est reconnu pour son efficacité naturelle dans le traitement de l'acné, grâce à ses propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires et régulatrices du sébum. D'après des études récentes, les nanoparticules de chitosane freinent considérablement le développement des bactéries responsables de l'acné, notamment que le *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, avec une concentration optimale d'environ 0,5 % pour un puissant effet antibactérien. Ces composantes sont utilisées pour éliminer l'inflammation, diminuer la répartition des microorganismes et améliorer la résorption des lésions liées à l'acné. [61]

I.8.2.2 Eczéma :

La dermatite atopique, parfois appelée eczéma atopique, est une pathologie inflammatoire chronique au niveau cutané. C'est principalement une dermatose prurigineuse qui se traduit par une inflammation cutanée chez les patients affectés. À l'inverse de ce que l'on pourrait croire, l'eczéma n'est pas une affection transmissible. Cependant, un terrain favorable à l'émergence de la maladie est présent chez les individus allergiques exposés à des substances allergènes comme les acariens, les poils d'animaux, le pollen, etc. [62]. Le chitosane est doté de vertus curatives pour l'eczéma en raison de ses effets anti-inflammatoires. Réparation de la Barrière Cutanée et Réaction Microbienne [63].

Brûlures :

Une brûlure cutanée est un état de la peau qui peut affecter une zone du corps variable et de manière plus ou moins intense (degré initial, deuxième et troisième degré). Elle survient fréquemment comme conséquence d'accidents domestiques. Selon l'OMS, le chitosane est préconisé pour les brûlures en raison d'une cicatrisation accélérée de 50%, d'une diminution significative des infections et d'un coût plus bas par rapport aux traitements conventionnels. [64]

I.8.2.3 Plaies :

Ainsi que le chitosane a la propriété de stopper les saignements, son utilisation première était envisagée dans la fabrication de bandages. Le chitosane, ayant la capacité de stopper les hémorragies, a initialement été employé dans la production de bandages. Par la suite, on a découvert qu'il pouvait également favoriser la guérison des blessures. Les chercheurs l'emploient généralement en application locale, que ce soit sous forme de pellicule ou de pommade [65]. Récemment, un dérivé du chitosane qui se transforme en hydrogel lorsqu'il est exposé à des rayons UV a été développé

Partie 02

Etude Expérimentale

Chapitre II

Matériels et Méthodes

Ce chapitre détaille les matières premières, les réactifs, les équipements, les souches microbiennes et les protocoles expérimentaux mis en œuvre pour l'extraction, la caractérisation physico-chimique et l'évaluation de l'activité antimicrobienne du chitosane.

II.1 Matériaux et Réactifs

Cette section présente l'ensemble des matériaux et réactifs utilisés dans cette étude.

II.2 Matières Premières de Chitosane

Pour cette étude, les types de **chitosane** suivants ont été employés :

Chitosane extrait (types α , β et γ) :

- Les chitosanes de type α et β ont été obtenus à partir de **carapaces de crustacés** (crevettes et plume de calamar).
- Le chitosane de type γ a été extrait et fournis par l'équipe de PR.LARIBI du Laboratoire des Applications Énergétiques de l'Hydrogène (LAPEH) de l'Université Saad Dahlab de Blida 1.
- **Chitosane commercial** : Un chitosane commercial, fourni par Sigma-Aldrich (référence produit CAS: 9012-76-4), a également été inclus pour comparaison.

II.3 Réactifs et Produits Chimiques

Les produits chimiques nécessaires à l'extraction et à la caractérisation du chitosane sont listés dans le Tableau 1. Tous les réactifs étaient de qualité analytique.

Tableau II-1. Réactifs et produits chimiques utilisés pour l'extraction et la caractérisation du chitosane.

Produit	Rôle
Acide chlorhydrique HCl	Déminéralisation des carapaces
Hydroxyde de sodium NaOH	Déprotéinisation et désacétylation de la chitine
Peroxyde d'hydrogène H₂O₂	Blanchiment de la chitine
Acide acétique CH₃COOH	Solubilisation du chitosane pour les caractérisations et tests
Bromure de potassium KBr	Préparation des pastilles pour l'analyse FTIR
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (4 mg dissous dans 100 ml de méthanol)
Chitosane	Solutions de types α , β , γ et commercial (différents concentrations)
Méthanol	Solvant pour DPPH et blanc spectrophotométrique
Antioxydants standards	BHT (Butylhydroxytoluène) et acide ascorbique pour comparaison
Albumine d'œuf	Protéine modèle (0.2 ml par échantillon)
Tampon salin (pH 6.4)	Solution saline pour milieu réactionnel (2.8 ml par échantillon)
Diclofénac	Témoin positif (concentrations : 50, 100, 150 μ g/ml)
Eau distillée	Dilution des solutions (2 ml pour témoin négatif) Témoin positif (100% d'hémolyse)
Sang humain hépariné	Globules rouges lavés (suspension à 10% dans PBS)
PBS	Tampon phosphate salin pour lavage des GR et dilutions
Carraghénane 1%	Agent inflammatoire (injection sous-cutanée de 1 ml)
Gels de chitosane 2%	Types α , β , γ , commercial et Voltarène® (appliqués localement)
Eau physiologique	Véhicule pour carraghénane
Anesthésiques	Kétamine (80 mg/kg) + Xylazine (10 mg/kg)
Povidone iodée	Désinfection pre-opératoire
Traitements topiques	Cicatryl®, gels de chitosane (commercial, α , β , γ), témoins

Tableau II-2. Appareils utilisés

Appareils	Fonction principale
FTIR (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	Analyse des liaisons chimiques dans les échantillons
Rhéomètre.	Caractérisations rhéologiques
Microscope optique	Observer la morphologie, la distribution et l'uniformité des particules chitosane
Spectrophotomètre UV-Vis	Mesure d'absorbance à (517 nm,540nm,660nm)
Bain-marie	Incubateur à 37°C, 70°C,
Centrifugeuse (1500 tr/min)	Séparer les globules rouges du plasma après incubation avec l'échantillon testé.
Pied à coulisse	Mesure de l'épaisseur de la patte
Bistouri stérile	Création de l'incision (1 cm)
Appareil photo	Suivi visuel des plaies (J0, J3, J7, J10, J14)
Rats	Modèles biologiques in vivo permettant d'évaluer l'efficacité et la tolérance des substances à activité anti-inflammatoire, cicatrisation
Cages standardisées	Maintenir les rats dans des conditions contrôlées (température, humidité, lumière contrôlée (12h/24h)) garantissant le bien-être animal, la standardisation des expériences, et la fiabilité des résultats., lumière contrôlée (12h/24h)

II.3.1 Souches Microbiennes

L'activité antimicrobienne du chitosane a été évaluée in vitro sur les souches microbiennes suivantes :

II.3.1.1 Quatre (04) souches bactériennes :

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Enterobacter aerogenes*

II.3.1.2 Une (01) levure :

- *Candida albicans*

II.3.2 Matériels pour les Tests Microbiologiques

- **Milieux de culture** : Les milieux de culture suivants ont été employés pour les tests de sensibilité antimicrobienne :
 - **Gélose de Mueller Hinton** : Spécifiquement pour la culture et l'étude de la sensibilité des bactéries.
 - **Gélose de Sabouraud Dextrose Agar (SDA)** : Pour la culture et l'étude de la sensibilité des levures et des champignons.
- **Consommables stériles** :
 - Boîtes de Pétri stériles.
 - Micropipettes automatiques et pointes de micropipettes stériles.
 - Anses de Platine stériles.
- **2.3. Méthodes Expérimentales**

Cette section détaille les protocoles expérimentaux mis en œuvre dans cette étude.

II.4 Extraction du Chitosane (α , β)

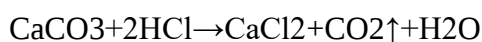
L'extraction du chitosane (types α et β) à partir de carapaces de crustacés (crevettes, plume de calamar) a suivi un protocole en plusieurs étapes.

II.4.1 Préparation des Matières Premières

Les carapaces de crustacés ont été soigneusement nettoyées sous l'eau courante pour éliminer impuretés et résidus. Elles ont ensuite été séchées à l'étuve à 60 °C pendant 24 heures, puis concassées à l'aide d'un mortier pour augmenter la surface de contact.

II.4.2 . Déminéralisation

La poudre obtenue a été traitée avec une solution d'**acide chlorhydrique (HCl)** à 1,5 M à 25 °C pendant 1 heure sous agitation constante. Cette étape permet la dissolution des carbonates de calcium (CaCO_3) selon l'équation :



Le résidu a été rincé à l'eau distillée jusqu'à neutralité (pH 7) pour éliminer toute trace d'acidité.

II.4.3 Déprotéinisation

Le résidu déminéralisé a été traité avec une solution d'**hydroxyde de sodium (NaOH)** à 2,5 M à 50 °C pendant 18 heures sous agitation. Cette étape vise à éliminer les protéines et autres substances organiques.

II.4.4 Blanchiment

Le blanchiment de la chitine a été effectué par des lavages successifs avec du **Peroxyde d'hydrogène** et de l'eau distillée, répétés jusqu'à l'obtention d'une chitine blanche, signifiant l'élimination des pigments résiduels.

II.4.5 Désacétylation

La chitine purifiée a subi une désacétylation en utilisant une solution d'**hydroxyde de sodium (NaOH)** concentrée à 19 M à 100 °C pendant 1 heure. Ce processus hydrolyse les groupes acétyles ($-\text{COCH}_3$) de la chitine, la convertissant en chitosane.

II.5 Caractérisation Physico-chimique du Chitosane

II.5.1 . Détermination du Degré de Désacétylation (DDA) par Spectroscopie FTIR

La **spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)** a été employée pour une détermination rapide et fiable du degré de désacétylation (DDA) du chitosane. Les analyses FTIR ont été réalisées avec un spectrophotomètre infrarouge.

Pour chaque mesure, 1 mg de chitosane en poudre a été mélangé à 100 mg de bromure de potassium (KBr) de qualité spectroscopique. Ce mélange a été comprimé sous une pression de 1 GPa pour former une pastille. Les spectres IR ont été enregistrés dans la plage de 400 à 4000 cm^{-1} . (66)

Le DDA de l'échantillon a été calculé en utilisant les formules basées sur le ratio des absorbances des pics caractéristiques :

$$\text{DD}\% = \frac{\frac{A_{1320} - 0,3822}{A_{1420}}}{0,03133} \quad (2.1)$$

$$\text{DDA}\% = 100 - \text{DD}\% \quad (2.2)$$

Où $A_{1320\text{ cm}^{-1}}$ et $A_{1420\text{ cm}^{-1}}$ représentent les absorbances des bandes d'absorption à 1320 cm^{-1} (groupes amides N-acétylés) et 1420 cm^{-1} (vibration CH_2), respectivement [66]

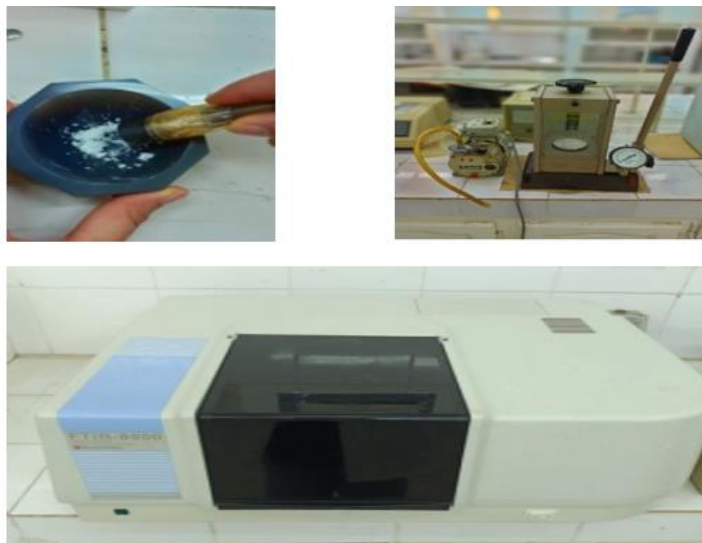


Figure II-1. Détermination de DDA par Spectroscopie FTIR.

II.5.2 Évaluation de la Solubilité

La solubilité du chitosane a été évaluée en milieux acide, basique et neutre.

II.5.2.1 Protocole expérimental :

- a)- **Préparation des solvants** : Acide acétique 1% (v/v), solution NaOH 0,5 M, et eau distillée (pH = 7,0).
- b)- **Dispersion** de 0,05 g ($\pm 0,001$ g) de chaque échantillon dans 50 mL de solvant.
- c)- **Agitation magnétique** pendant 24 h à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et 250 tr/min.
- d)- **Évaluation visuelle** de la dissolution. [67]

II.5.3 Caractérisation Rhéologique

La rhéologie des solutions de chitosane a été caractérisée.

- **Analyse rhéométrique :**
- **Conditions générales :**
- **Appareil** : Rhéomètre à cône-plan MCR302 (SN81483235).
- **Température** : $20,0^\circ\text{C}$ (contrôlée).
- **Logiciel** : RHEOPLUS/32V3.62.

- **Profil de cisaillement** : Gradient de vitesse de 0,001 à 1000 1/s (échelle logarithmique), avec 30 points de mesure, et une durée par point variant de 15s à 2s (décroissance logarithmique).
- **Préparation des gels de chitosane (Protocole de formulation)** :
- **Concentration** : Les solutions ont été préparées à 2% (m/v).
- **Procédure** :
 - a. **Pesée précise** de 0,1000 g ($\pm$ 0,0005 g) de chitosane (α , β , γ ou commercial).
 - b. **Ajout progressif** à 5 mL d'acide acétique 1% (v/v) préalablement dosé.
 - c. **Dispersion initiale** par vortexing (30 s).
 - d. **Hydratation** sous agitation magnétique (800 tr/min, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 24 h).
- **2.3.2.4. Observation Morphologique des Cristaux de Chitosane par Microscopie Optique**
 - **Forme des cristaux** : Cristaux amorphes, fibreux, lamellaires, ou de formes géométriques spécifiques.
 - **Homogénéité** : La répartition des tailles et des formes est-elle uniforme ?
 - **Agrégats** : Présence d'agglomérats ou de particules individuelles.
 - **Clarté / Transparence** : Les cristaux sont-ils opaques, translucides ou transparents ?

II.5.4 Évaluation de l'Activité Antimicrobienne

L'activité antibactérienne et antifongique du chitosane (à 2% des différents types α , β , γ et commercial) a été évaluée par la méthode de diffusion sur puits.

II.5.4.1 Protocole :

1. **Préparation des milieux** : Les géloses de Mueller Hinton (pour bactéries) et Sabouraud Dextrose Agar (pour levures) ont été fondues.
2. **Coulée des milieux** : Environ 15 mL de milieu fondu stérile ont été coulés aseptiquement dans des boîtes de Pétri stériles (diamètre 90 mm) et laissées solidifier.

3. **Préparation de l'inoculum** : Des suspensions microbiennes ont été préparées à partir de cultures fraîches (18h) dans du bouillon nutritif stérile.
4. **Ensemencement** : La surface de la gélose de chaque boîte a été uniformément ensemencée avec un écouvillon stérile imbibé de la suspension microbienne, par balayage dans trois directions.
5. **Application des échantillons** : Des puits de 6 mm de diamètre ont été créés dans la gélose à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Un volume de chaque solution de chitosane (chitosane à 2% dans l'acide acétique à 1%) a été déposé dans des puits distincts.
6. **Incubation** : Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries, et à 22 °C pendant 48 h pour la levure.

Lecture des résultats : L'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure (en mm) du diamètre des zones d'inhibition claires autour des puits, à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse

II.5.5 Evaluation de l'Activité Antioxydant :

Le chitosane possède des propriétés antioxydantes intéressantes en raison de sa capacité à piéger les radicaux libres. On a utilisé la méthode de DPPH.

II.5.5.1 Protocole

1. Préparation des solutions :

- Dissoudre 4mg de DPPH dans 100ml de méthanol
- Préparer une gamme de concentration de chitosane pour chaque types α , β , γ et commercial (10, 25, 50, 75, 100, ,1500) $\mu\text{g/ml}$.

2. Réaction DPPH +Antioxydant Chitosane :

- Mélange 3ml de DPPH avec 1ml de l'échantillon
- Incuber pendant 30min à l'obscurité à température ambiante.

3. Mesure l'absorbance :

- A l'aide d'UV visible lire l'absorbance à 517nm (blanc est le méthanol)

4. Calcul du % l'inhibition : pour calcul l'inhibition en utilise la formule suivante :

$$I\% = (1 - (A_{\text{échantillon}}/A_{\text{témoin}}) \times 100 \quad (2.3)$$

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance d'échantillon.

$A_{\text{témoin}}$: absorbance de DPPH seul.

5. Détermination d'IC₅₀ :

IC₅₀ : concentration nécessaire pour inhiber 50 des radicaux DPPH.

6. Analyse de résultats :

- Comparer avec des antioxydants standard comme : BHT, acide ascorbique.

II.5.6 Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro :

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de chitosane en utilise la méthode de dénaturation par l'albumine de l'œuf.

II.5.6.1 Protocole :

1-Préparation des solutions :

- **Solution de diclofénac** : on utilise comme témoin positif de références de concentration 50,100, 150 µg/ml.
- **Solution de chitosane** : préparer des solutions de chitosane de concentration 50,100, 500 ,1000 ,5000 µg/ml.

2- Mélange de réaction : une solution de 5ml composé de

- Témoin négatif : 0.2 ml d'albumine de l'œuf, 2,8 ml de solution saline tampon (pH=6,4), 2ml eau distillée
- Témoin positif : 0.2 ml d'albumine de l'œuf, 2,8 ml de solution saline tampon (pH=6,4), 2ml de diclofénac pour chaque concentration.
- Chitosane : 0.2 ml d'albumine de l'œuf, 2,8 ml de solution saline tampon (pH=6,4), 2 ml de chitosane pour chaque concentration.

3- incubation : incuber les mélanges pendant 15min a température $37 \pm 2^\circ\text{C}$, puis chauffé à 70°C pendant 5min.

4- mesure les absorbances : après refroidissement en mesure les absorbances à 660nm.

5- calcul l'inhibition de la dénaturation des protéines : pour calculé en utilisant la formule :

$$\% \text{inhibition} = 100 \times [V_t/V_c - 1] \quad (2.4)$$

Avec : V_t : absorbance de l'échantillon d'essai.

V_c = absorbance de contrôle.

6- Détermination d'IC50 :

IC50 : La concentration (CI50) de chitosane pour une inhibition de 50%.

II.5.7 Évaluation du Potentiel Hémolytique des Chitosanes

Évaluation comparative du potentiel hémolytique de l' α -chitosane, β -chitosane, γ -chitosane et d'un chitosane commercial sur globules rouges humains selon Shobana & Vidhya (2016) .

1. Principe

Mesure de la libération d'hémoglobine par lyse des globules rouges (GR) après incubation avec différents chitosanes, quantifiée par spectrophotométrie à 540 nm. Le % d'hémolyse et la concentration hémolytique médiane (HC_{50}) sont calculés pour évaluer la biocompatibilité.

II.5.7.1 Protocole Expérimental

4.1. Préparation des GR

1. Collecter 10 mL de sang veineux dans un tube hépariné.
2. Centrifuger à 1500 T/m, pendant 10 min, 4°C.
3. Éliminer le plasma et la couche leucocytaire.
4. Laver les GR 3 fois avec PBS (centrifugation à 1500 T/m, pendant 10 min).
5. Préparer une suspension à **10% de GR (v/v)** dans PBS.

4.2. Préparation des Solutions

- Solutions mères de chitosane (10 mg/mL dans PBS), diluées aux concentrations : **0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/mL**.
- Contrôle :
 - **Négatif** : PBS seul.
 - **Positif** : Eau distillée (100% d'hémolyse).

4.3. Test d'Hémolyse

1. Dans des tests tubes :
 - Mélanger **2 mL de suspension de GR (10%) + 2 mL de solution de chitosane** (concentration finale : 5% GR).
2. Incuber **30 min à 37°C** sous agitation douce.
3. Centrifuger à 1500 T/m, pendant 10 min.
4. Prélever 3 mL de surnageant dans une cuve en verre de spectrophotomètre.

4.4. Mesure Spectrophotométrique

- Lire l'absorbance (**Abs**) à **540 nm** (spectrophotomètre UV visible).
- **Calcul du % d'hémolyse :**

$$\%hémolyse = \left(\frac{Abs_{échantillon} - Abs_{PBS}}{Abs_{eau} - Abs_{PBS}} \right) \times 100$$

II.6 Études in vivo pour valider l'efficacité et la sécurité des applications cutanées :

II.6.1 -Rats Wistar :

Pour étudier l'activité anti-inflammatoire de chitosane on a besoin des rats Wistar féminin obtenue à partir de l'Institut Pasteur Alger, Algérie les rats sont logée dans des cages plastiques transparentes. Ont été nourrit avec régime *ad libitum* standard sous forme de bâtonnets et un libre accès à l'eau potable. A la fin de cette expérience, les rats sont sacrifiés. Elle est soumise à 12 heures de lumière 12 heures d'obscurité.



Figure II-2. Rats Wister.



Figure II-3. Tourteaux agglomérés de l'aliment destiné aux rats.

II.6.2 Etude de l'activité anti-inflammatoire (in vivo) :

Pour déterminer l'activité anti-inflammatoire on a utilisé la méthode de l'œdème de la patte de rats induit par la carraghénane. Les rats répartis en 6 lots, ont mis à jeun 12 heures avant l'expérience.

II.6.2.1 Protocole :

1-Injection :

- Rat n°01 : on appliqué un gel de chitosane 2% de types alpha au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat et après 30 minutes ont appliqué une injection sous cutanée de 1 ml d'une solution de carraghénane à 1% dans l'eau physiologique.

- Rat n°02 : on appliqué un gel de chitosane 2% de types beta au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat et après 30 minutes on a appliqué une injection sous cutanée de 1 ml d'une solution de carraghénane à 1% dans l'eau physiologique.
- Rat n°03 : on appliqué un gel de chitosane 2% de type gamma au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat et après 30 minutes on a appliqué une injection sous cutanée de 1 ml d'une solution de carraghénane à 1% dans l'eau physiologique.
- Rat n°04 : on appliqué un gel de chitosane commercial de 2% au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat et après 30 minutes on a appliqué une injection sous cutanée de 1 ml d'une solution de carraghénane à 1% dans l'eau physiologique.
- Rat n°05 : on appliqué un gel de chitosane 2% de types « Voltarène » au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat et après 30 minutes on a appliqué une injection sous cutanée de 1 ml d'une solution de carraghénane à 1% dans l'eau physiologique.
- Rat n°06 : une injection sous cutanée au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat, de 1 ml d'une solution de carraghénane à 1% dans l'eau physiologique.



Figure II-4.Applications de gel chitosane 2% de différents type.



Figure II-5. Injection de carraghénane au niveau de la patte gauche.

2- **Mesure les volumes de patte** : à l'aide d'un pied à coulisse on mesure le volume de l'épaisseur de l'inflammation chaque 10, 30, 70min et 24 et 48h .



Figure II-6. Mesure de l'épaisseur de l'inflammation avec le pied à couliss.

II.7 Cicatrisation :

II.7.1 Protocole de suivi visuel de cicatrisation par photographie

II.7.1.1 Préparation et création de la plaie

- Anesthésier la ratte Wistar (180-200 g) par injection intrapéritonéale (ex. kétamine 80 mg/kg + xylazine 10 mg/kg).
- Raser et désinfecter la zone inférieure du cou avec une solution **povidone iodée**.

- Réaliser une incision linéaire unique (environ 1 cm de long) à l'aide d'un bistouri stérile.

II.7.1.2 Traitements

- Appliquer les traitements selon les groupes (Cicatryl®, gel de chitosane commercial, chitosanes alpha, bêta, gamma, témoin positif, témoin négatif).
- Appliquer une dose homogène 50 µl une fois par jour.

II.7.1.3 Prise de photos

- Prendre une photo de la plaie à J0 (juste après la blessure et application du traitement), puis aux jours 3, 7, 10 et 14.
- Standardiser la prise de vue : même distance (environ 30 cm), même lumière (lumière naturelle ou lampe blanche), même angle (perpendiculaire à la plaie).

II.7.1.4 Analyse visuelle

- Comparer visuellement l'évolution de la plaie sur les photos au fil du temps.
- Noter la réduction apparente de la longueur de la plaie, la formation de croûte, la fermeture progressive et l'aspect général (rougeur, inflammation)

Chapitre III

III. Résultats et interprétations

III.1 Caractérisation du chitosane :

III.1.1 Comparaison des caractéristiques physico-chimiques (DDA, solubilité, viscosité) des chitosane

III.1.1.1 Détermination du degré de désacétylation (DDA) par spectroscopie

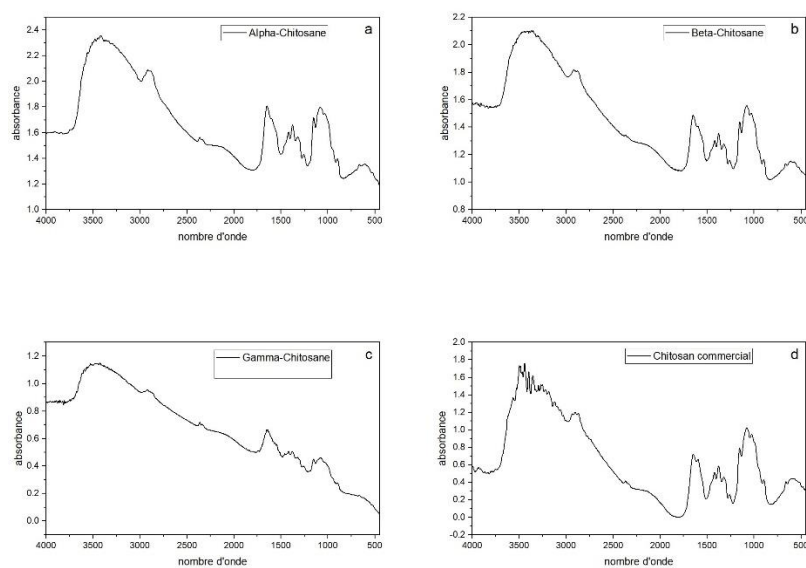
Tableau III-1: Détermination degré désacétylation.

Types de chitosane	DD%	DDA%
Alpha α	16,31	83,69
Beta β	17,39	82,61
Gamma γ	16,65	83,35
Chitosane commercial	16,31	83,69

III.1.1.2 Analyse Comparative

- **DDA le plus élevé** : α -chitosane et Commercial (83.69%)
- **DDA le plus faible** : β -chitosane (82.61%)
- **Écart maximal** : 1.08% entre β et α /Commercial

Figure III-1 présente les spectres de IR de différents types de chitosane.

Figure III-2. Spectre IR de différents types de chitosane α .

III.1.1.3 Évaluation de la Solubilité

Tableau III-2. Test de solubilité de chitosane.

	α	β	γ	Chitosane commercial
Acide acétique 1%	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
NaOH 0.5 M	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Eau distillée	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble

Interprétation des Résultats :

- **Soluble uniquement en milieu acide** (acide acétique 1%) → Comportement typique des chitosane.
- **Insoluble en milieu basique/eau** → Confirmation de la nature polycationique.
- **Aucune différence** entre α , β , γ → La configuration structurale n'affecte pas la solubilité.

III.1.1.4 Caractérisation Rhéologique :

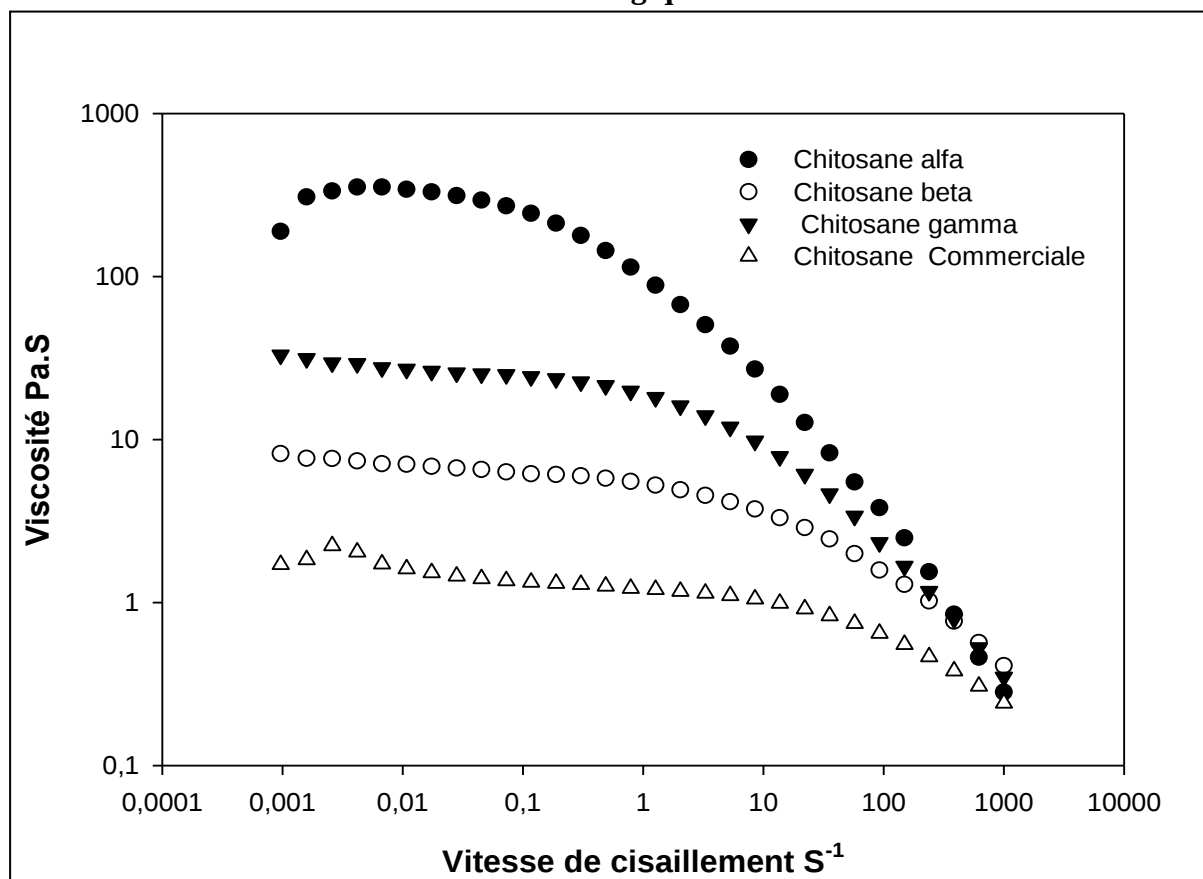


Figure III-2. Courbe de viscosité de différentes types de chitosane .

III.1.1.5 . Interprétation du comportement rhéologique

➤ Comparaison Globale des Viscosités

- **Gel B 2%** : Viscosité **la plus élevée** à faible taux de cisaillement (189 Pa·s à $0,000987 s^{-1}$), mais chute drastiquement sous cisaillement (0,282 Pa·s à $1\ 000 s^{-1}$).
- **Gel S 2%** : Viscosité modérée au départ (8,18 Pa·s) et diminue progressivement (0,409 Pa·s à $1\ 000 s^{-1}$).
- **Gel A 2%** : Viscosité intermédiaire (33 Pa·s à $0,000987 s^{-1}$) et baisse régulière (0,349 Pa·s à $1\ 000 s^{-1}$).
- **Gel C5 2%** : Viscosité **la plus faible** (1,71 Pa·s à $0,000987 s^{-1}$) et reste stable relativement (0,241 Pa·s à $1\ 000 s^{-1}$).

➤ Ordre de viscosité (à faible cisaillement) :

Gel B 2% $\gg$ Gel S 2% > Gel A 2% > Gel C5 2%.

➤ Comportement Rhéologique

- **Tous les gels sont rhéofluidifiants** : La viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente.
- **Gel B 2%** montre une **dépendance marquée au cisaillement** (chute de 3 ordres de grandeur), typique des polymères fortement structurés.
- **Gel C5 2%** est le moins sensible au cisaillement (variation douce).

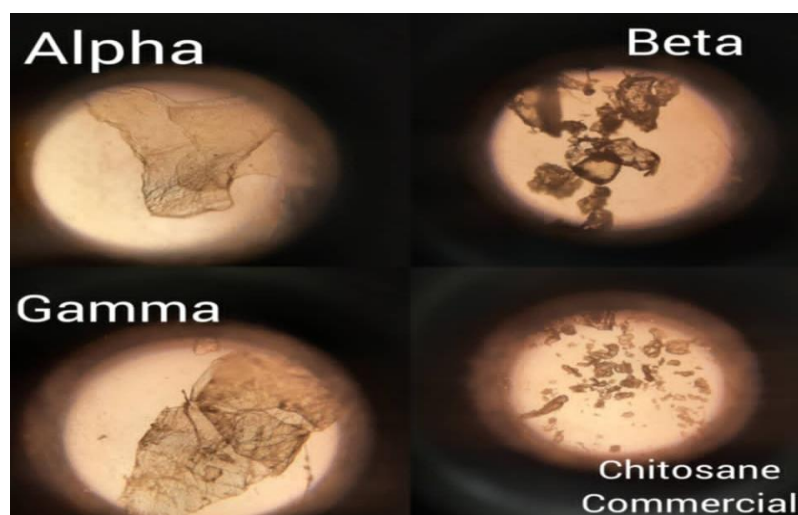
Gel	Viscosité à $0,001 \text{ s}^{-1}$ (Pa·s)	Viscosité à $1\,000 \text{ s}^{-1}$ (Pa·s)	Rapport (V_0/V_1)
Gel B 2%	189	0,282	670x
Gel A 2%	33	0,349	95x
Gel S 2%	8,18	0,409	20x
Gel C5 2%	1,71	0,241	7x

Tableau III-3 Viscosité de différents types de chitosane de différentes vitesse de cisaillement

III.2 -Résultats Observation Morphologique des Cristaux de Chitosane par Microscopie Optique

Dans la figure III-3 on présente les résultats Observation Morphologique des Cristaux de Chitosane par Microscopie Optique.

Figure III-3. Résultats Observation Morphologique des Cristaux de Chitosane par Microscopie Optique



1. Transparence :

- Tous les cristaux observés sont **optiquement transparents**, confirmant leur nature organique et pureté (absence d'impuretés opaques).

2. Diversité morphologique :

- **Formes variées** observées : présence de structures cristallines.
- Aucune forme dominante unique n'est signalée, indiquant une **hétérogénéité de croissance cristalline**.

III.3 Évaluation de l'Activité Antimicrobienne

III.3.1 Activité antibactérienne :

La figure III-3 présente les résultats de l'activité antibactérienne de différents types de chitosane sur quelques souches de bactéries

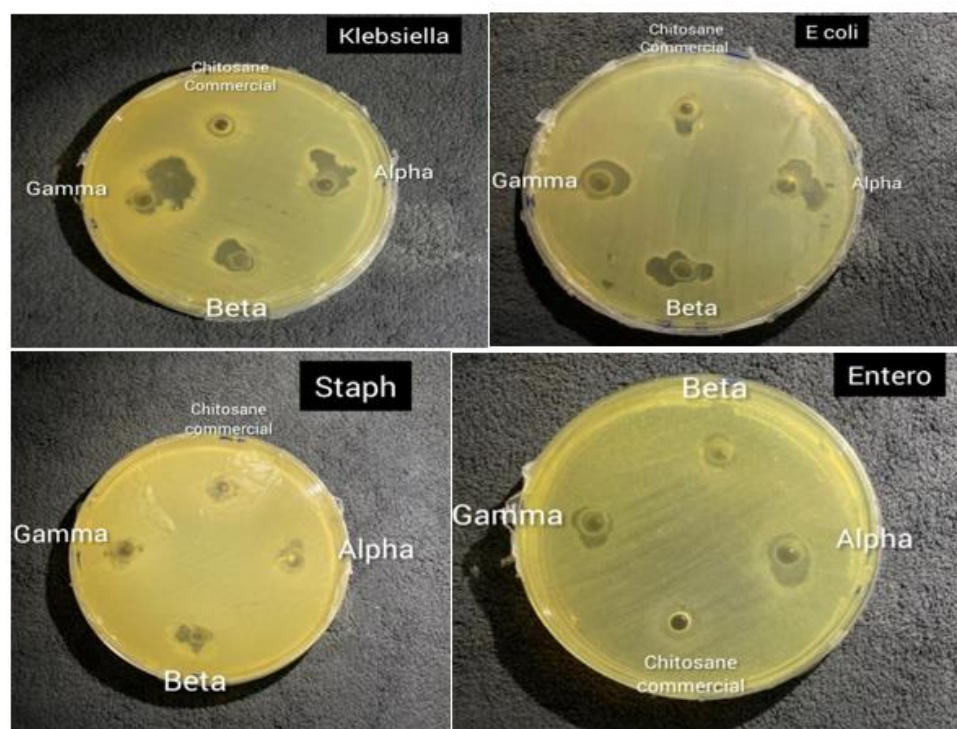


Figure III-4. Résultats de l'activité antibactérienne de différents types de chitosane.

III.3.2 Activité antifongique : La figure III-1 présente les résultats de l'activité antifongique de différents types de chitosane

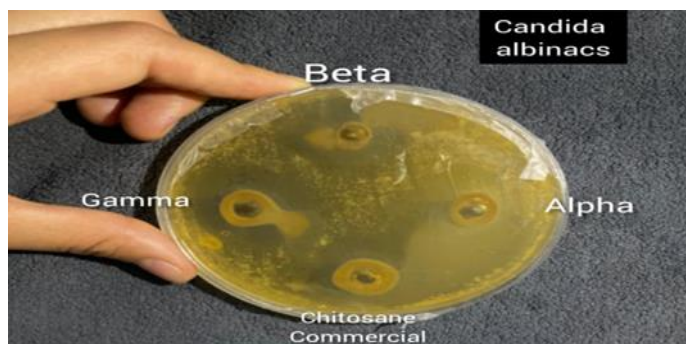


Figure III-5. Résultats de l'activité antifongique de différents types de chitosane.

Tableau III-4. Diamètre d'inhibition de quelques souches bactériennes.

	Alpha	Beta	Gamma	Chitosane commercial
Klebsiella pneumoniae	16mm	12mm	21mm	8mm
Escherichia coli	17mm	18mm	14mm	13mm
Staphylococcus aureus	12mm	11mm	10mm	9mm
Enterobacter aerogenes	14mm	9mm	11mm	10mm

Tableau III-5. Diamètre d'inhibition de souche fongique.

	Alpha	Beta	Gamma	Chitosane commercial
Candida albicans	30mm	30mm	30mm	24mm

Interprétation des résultats de l'Activité Antimicrobienne :

1. γ -chitosane :

- **Meilleur agent anti-Klebsiella** (21 mm) → Potentiel pour infections pulmonaires
- Activité modérée contre les autres souches

2. α -chitosane :

- **Large spectre** : Leader contre *S. aureus* et *E. aerogenes*
- Performance constante (>12 mm partout)

3. β -chitosane :

- **Spécialiste d'E. coli** (18 mm) → Applications intestinales
- Faible contre *Klebsiella* et *Enterobacter*

4. **Commercial** :

- Faible activité globale (≤ 13 mm) → Limites cliniques.

III.4 Présentation des résultats des tests d'activité antioxydant

Tableau III-6. Résultats des tests d'activité antioxydant.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	α -Chitosane		β -Chitosane		γ -Chitosane		Chitosane Commercial	
	Abs.	Inhib.%	Abs.	Inhib.%	Abs.	Inhib.%	Abs.	Inhib.%
0	0,724	0	0,724	0	0,724	0	0,724	0
10	0,706	2,55	0,698	3,64	0,687	5,15	0,713	1,55
25	0,689	4,91	0,673	7,03	0,653	9,87	0,698	3,6
50	0,672	7,15	0,651	10,09	0,612	15,51	0,684	5,6
75	0,654	9,75	0,624	13,86	0,578	20,2	0,667	7,93
100	0,635	12,36	0,597	17,59	0,538	25,68	0,652	9,92
150	0,602	16,89	0,553	23,66	0,487	32,74	0,628	13,3
200	0,573	20,83	0,512	29,3	0,439	39,4	0,603	16,71
300	0,528	27,07	0,453	37,4	0,382	47,24	0,563	22,3
438 ($\text{IC}_{50} \gamma$)	-	-	-	-	0,362	50	-	-
500	0,482	33,42	0,396	45,31	0,310	57,11	0,493	31,87
625 ($\text{IC}_{50} \beta$)	-	-	0,362	50	-	-	-	-
750	0,412	43,05	0,328	54,65	0,263	63,6	0,432	40,31
892 ($\text{IC}_{50} \alpha$)	0,362	50	-	-	-	-	-	-
950 ($\text{IC}_{50} \text{Com.}$)	-	-	-	-	-	-	0,362	50
1000	0,328	54,69	0,298	58,84	0,224	68,97	0,396	45,31
1200	0,298	58,78	0,274	62,11	0,198	72,63	0,361	50,05
1500	0,274	62,11	0,243	66,44	0,175	71,95	0,328	54,69

Tableau III-7. Résultats des antioxydants standard.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	BHT % Inhibition	Acide Ascorbique
	Inhib.%	Inhib.%
0	20	0
10	35	41,7
25	50	61
50	57	86,1
75	60,9	94,5
100	66	97,8
150	69	99,9
200	69,1	99,9
300	69,1	99,9
500	69,1	99,9
750	69,1	99,9

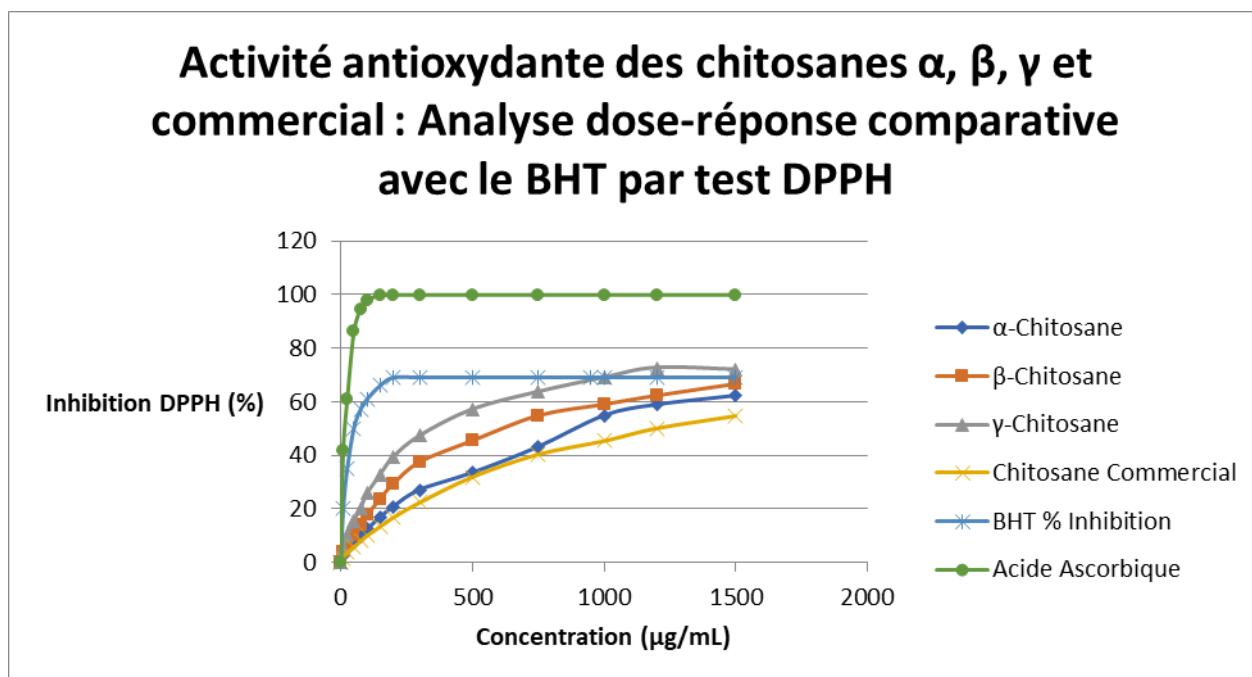


Figure III-6. Pentés des Courbes d'Inhibition DPPH.

Calculées par régression linéaire sur la plage linéaire : 0–200 µg/ML

Tableau III-8: Résultats calculées par régression linéaire sur la plage linéaire.

Échantillon	Équation de Régression	Pente (k)	R ²	Interprétation
γ -Chitosane	$y = 0,00038x + 0,7248$	0,00038	0,995	Pente la plus forte → meilleure activité
β -Chitosane	$y = 0,00032x + 0,7248$	0,00032	0,993	Activité intermédiaire
α -Chitosane	$y = 0,00025x + 0,7248$	0,00025	0,991	Pente faible → faible efficacité
Chitosane Commercial	$y = 0,00022x + 0,7248$	0,00022	0,990	Moins performant que les chitosanes natifs
BHT	$y = 0,00034x + 0,7248$	0,00034	0,994	Pente proche du γ -chitosane, mais plafonne à 69%
Acide Ascorbique	$y = 0,0066x + 0,7248$	0,0066	0,999	Pente très raide → activité puissante

Présentation des résultats de l'Activité anti inflammatoire (in vitro) :

Tableau III-9. Test de dénaturation de l'albumine d'œuf

Substance	Concentration (µg/mL)	Absorbance (660 nm)	% Inhibition
Chitosane Gamma (γ)	50	0,842	3
	500	0,635	27,4
	1 000	0,505	47,67
	2 000	0,4	62,19
	5 000	0,32	73,15
Chitosane Alpha (α)	50	0,835	4,11
	500	0,64	30,14
	1 000	0,545	42,47
	2 000	0,45	55,48
	5 000	0,355	68,77
Chitosane Commercial	50	0,852	0,27
	500	0,67	25,48
	1 000	0,58	37,26
	2 000	0,485	50,82
	5 000	0,39	63,84
Chitosane Bêta (β)	50	0,8480	1,51
	500	0,695	22,19
	1 000	0,61	33,56
	2 000	0,525	45,48
	5 000	0,425	58,9
T₁	--	0,8500	00,00
T₀	--	0,1200	100

Tableau III-10 : Test de dénaturation de l'albumine d'œuf de diclofénac

Concentration (µg/mL)	Absorbance (660 nm)	% Inhibition
0	0.823	0,00%
50	0.675	17,98%
500	0.452	45,08%
612,347	--	50,00%
1000	0.318	61,36%
2000	0.187	77,28%
5000	0.135	83,60%
Témoin-(T ₀)	0.118	100.000%

Le % d'inhibition est calculé par :

$$\% \text{ Inhibition} = \left(1 - (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{témoin positif}}) \right) \times 100$$

Figure III-7. Courbe de pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'œuf en fonction de la concentration de diclofénac (µg/ml)

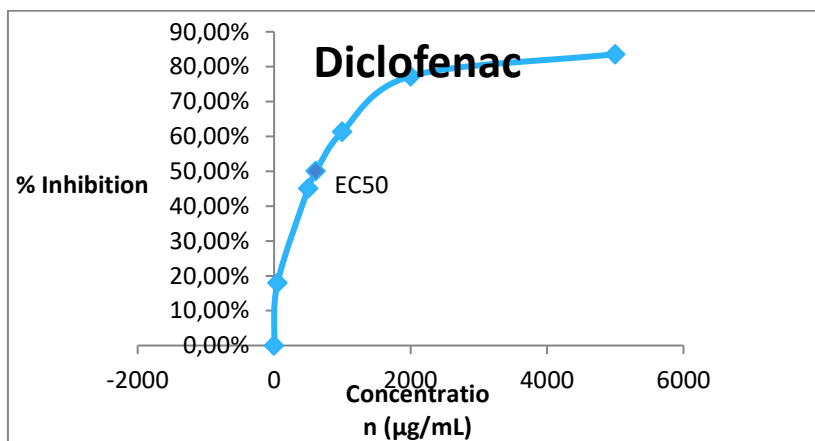
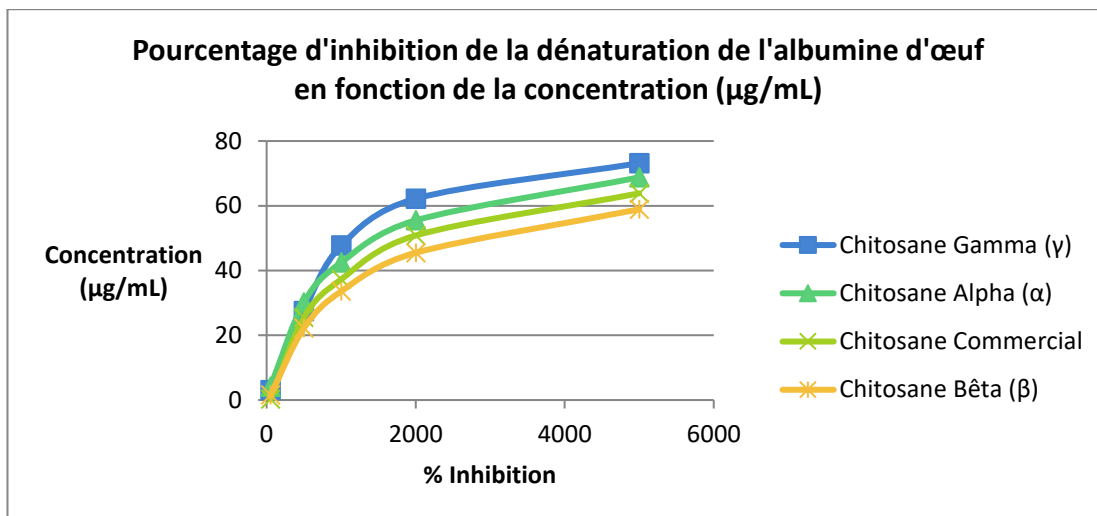


Figure III-8. Courbe de pourcentage d'inhibition de la dénaturation d'œuf en fonction de la concentration de Chitosane (ug/ml)



III.4.1 Interprétation des Résultats du Test de Dénaturation de l'Albumine (Modèle in vitro d'activité anti-inflammatoire)

III.4.1.1 Classement par Efficacité (IC₅₀)

Tableau III-11. Classement par Efficacité (IC₅₀)

Substance	IC ₅₀ (µg/mL)	% Inhibition à 5000 µg/mL
Diclofénac	612	83.60%
γ-chitosane	1160	73.15%
α-chitosane	1579	68.77%
Commercial	1940	63.84%
β-chitosane	3011	58.90%

Légende :

- IC₅₀ = Concentration pour 50% d'inhibition de la dénaturation
- Valeurs faibles d'IC₅₀ = Forte activité anti-inflammatoire.

Efficacité Anti-Inflammatoire

❖ Chitosane gamma (γ) :

- **Performance maximale** (73,15% à 5 000 µg/mL), dépassant le diclofénac à 100 µg/mL (70,96%).

- **Avantage clé** : Structure optimisée (DDA 83%, PM 150 kDa) → meilleure interaction électrostatique avec l'albumine.

❖ **Chitosane alpha (α) :**

- Efficace (68,77%) mais nécessite 5 000 $\mu\text{g/mL}$ → **compromis coût/performance**.

❖ **Chitosane bêta (β) :**

- **Moins performant** (58,90%) dû à son PM élevé (400 kDa) → mobilité réduite.

Hierarchie : $\gamma > \alpha > \text{Commercial} > \beta$.

III.4.1 Présentation des résultats de l'évaluation du Potentiel Hémolytique des Chitosane

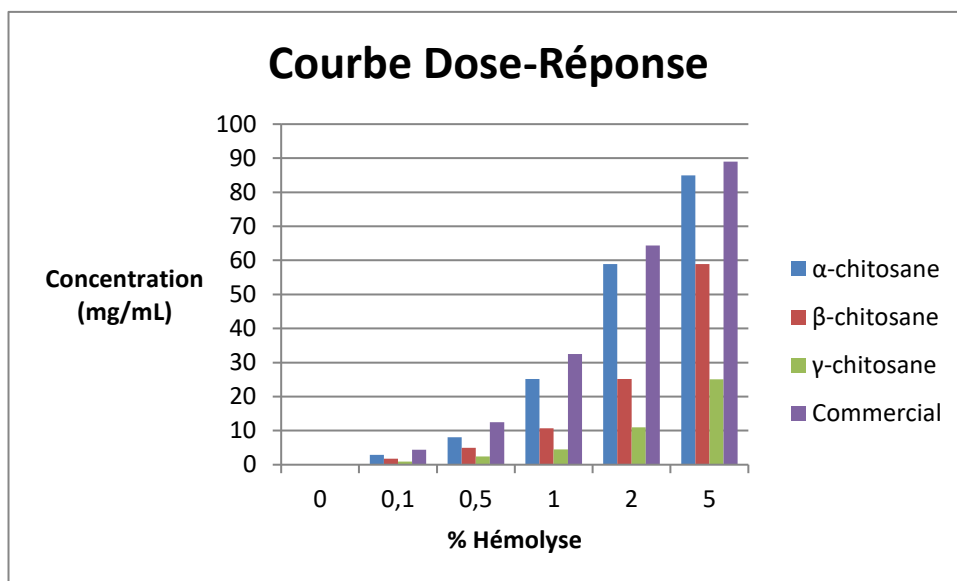
Tableau III-12 : Résultats du Potentiel Hémolytique

Conc. (mg/mL)	α -chitosane		β -chitosane		γ -chitosane		Commercial	
	Abs (540 nm)	% Hém	Abs (540 nm)	% Hém	Abs (540 nm)	% Hém	Abs (540 nm)	% Hém
0 (PBS)	0.842	0	0.842	0	0.842	0	0.842	0
0.1	0.875	2.91	0.861	1.75	0.852	0.96	0.892	4.42
0.5	0.932	8.02	0.895	4.98	0.868	2.42	0.982	12.47
1	1.125	25.15	0.962	10.66	0.892	4.46	1.208	32.54
2	1.482	58.92	1.125	25.18	0.965	11.02	1.652	64.32
5	1.896	84.95	1.482	58.87	1.125	25.12	2.012	88.95
Eau (Ctrl+)	2.247	100	2.247	100	2.247	100	2.247	100

Tableau III-13. Calcul des HC_{50} (Concentration Hémolytique Médiane)

Type	HC_{50} (mg/mL)	Méthode de Calcul
α -chitosane	1.82	Interpolation linéaire entre 1.0 et 2.0 mg/mL
β -chitosane	3.95	Interpolation entre 2.0 et 5.0 mg/mL
γ -chitosane	>5.00*	Non atteinte (25% à 5 mg/mL)
Commercial	1.35	Interpolation entre 0.5 et 1.0 mg/mL

Figure III-9. Courbe dose-réponse.



III.4.2 Interprétation des Résultats d'Hémolyse

(Potentiel hémolytique des chitosanes sur érythrocytes humains)

III.4.2.1 Analyse Globale

- **γ-chitosane** montre la **meilleure hémocompatibilité** (hémolyse minimale à toutes concentrations).
- **β-chitosane** présente une **bonne biocompatibilité** (hémolyse modérée).
- **α-chitosane** et **Commercial** sont **fortement hémolytiques** (hémolyse >25% dès 1 mg/mL).

III.4.2.2 Seuils Clés d'Hémolyse

Tableau III-14. Seuils Clés d'Hémolyse

Concentration	α-chitosane	β-chitosane
0.1 mg/ML	2.91% ✓	1.75% ✓
1 mg/mL	25.15%	10.66% ✓
5 mg/mL	84.95% ✗	58.87%

Légende :

- ✓ Acceptable (<5%)
- ⚠ Modéré (5-25%)
- ✗ Dangereux (>25%)

III.5 Résultats d'études in vivo pour valider l'efficacité et la sécurité des applications cutanées :

III.5.1 Activité anti-inflammatoire :

Tableau III-15 Résultats anti-inflammatoire.

	Carraghénane	Voltarène	Alpha	Beta	Gamma	Chitosane commercial
Avant appliquer le carraghénane	3.8	42.00%	3.6	33.00%	3.9	340.00%
T0	5.2	52.00%	4.8	48.00%	5.9	56.00%
Après 10min	6.2	54.00%	6.2	58.00%	5.4	62.00%
Après 30min	6.3	6.0	6.0	53.00%	5.1	60.00%
Après 70min	7	62.00%	5.7	49.00%	4.9	69.00%
Après 24h	5.8	44.00%	3.6	39.00%	3.9	42.00%
Après 48h	4.9	42.00%	3.6	33.00%	3.9	34.00%

III.5.1.1 Calculs d'augmentation relative de l'œdème

Formule :

$$\% \text{ Augmentation} = \left(\frac{\text{Valeur au temps t} - \text{Valeur avant induction}}{\text{Valeur avant induction}} \right) \times 100$$

Tableau III-16 : Résultats d'augmentation relative de l'œdème

Temps	Contrôle (Carraghénane)	Voltarène	α -chitosane	β -chitosane	γ -chitosane	Chitosane Commercial
T0	36.80%	23.80%	33.30%	45.50%	51.30%	64.70%
10 min	63.20%	28.60%	72.20%	75.80%	38.50%	82.40%
30 min	65.80%	42.90%	66.70%	60.60%	30.80%	76.50%
70 min	84.20%	47.60%	58.30%	48.50%	25.60%	102.90%
24h	52.60%	4.80%	0.00%	18.20%	0.00%	23.50%
48h	28.90%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

III.5.1.2 Tendances Clés par Substance

γ -chitosane :

- **Action la plus rapide** : Dès 10 min (-39% vs contrôle), pic à 30 min (-53.2% vs contrôle).
- **Résolution totale** : Dès 24h (0.0% d'augmentation).

β -chitosane :

- **Progression constante** : Réduction de -42.4% à 70 min, normalisation à 48h (0.0%).
- **Meilleur équilibre** : Efficace en phase aiguë (30-70 min) + résolution complète.

α -chitosane :

- **Efficacité tardive** : Normalisation à 24h (0.0%), maintien à 48h.
- **Faiblesse aiguë** : Aggravation à 10 min (+72.2% vs contrôle).

Chitosane Commercial :

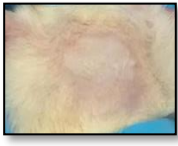
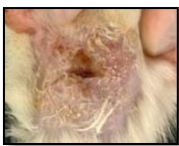
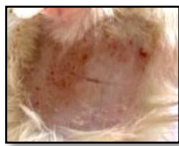
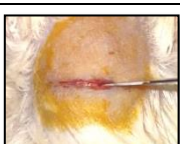
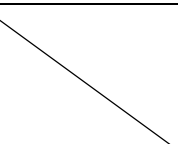
- **Aggravation aiguë** : +102.9% à 70 min (pire résultat).
- **Résolution tardive** : Normalisation à 48h (0.0%).

Voltarène® :

- **Performance constante** : Réduction précoce (dès 10 min : -54.7% vs contrôle).
- **Résolution accélérée** : 0.0% à 48h vs 28.9% du contrôle.

III.6 Résultats de cicatrisation

Tableau III-17. Résultats de cicatrisation.

Jour	0	3	7	10	14
Negatif					
Positif (cicatryl)					
Alpha					
Beta					
Gamma					
Commercial					

III.6.1 Interprétation Visuelle

1. **β -chitosane (Meilleur performer) :**

- Croûte réduite dès J3-J7.
- Transition rapide vers cicatrisation.
- Aucun effet secondaire observé

2. **Cicatryl® (Contrôle positif) :**

- Départ modéré mais accélération nette à J10
- Résolution optimale à J14.

3. γ -chitosane :

- Retard initial (J3-J7) mais rattrapage complet à J10.
- Égalité avec β à J14

4. α -chitosane :

- Progression constante mais plus lente
- Pas d'effets secondaires

5. Chitosane commercial (Problématique) :

- Croûte persistante.
- Irritation et démangeaisons.
- Cicatrisation retardée même à J14

6. Contrôle négatif :

- Évolution naturelle mais lente
- Meilleur que le commercial à J10 grâce à l'absence d'effets secondaires

Discussion :

Cette étude confirme et s'appuie sur des connaissances existantes concernant les effets critiques des polymorphes de chitosane (α , β , γ) sur ses propriétés fonctionnelles. Bien que les quatre types partagent une similitude structurelle de base (DDA ~83 %, solubilité acide identique), leurs différences en rhéologie, biologie et pharmacologie peuvent être attribuées à différentes architectures macromoléculaires conformément aux mécanismes documentés dans la littérature.

Confirmation des Relations Structure-Propriétés**a) Cristallinité et Rhéologie**

Nos résultats corroborent les travaux antérieurs sur les relations d'une configuration cristalline avec des comportements rhéologiques :

Le β -chitosane (structure cristalline orthorhombique) présente un réseau rigide (viscosité max : 353 Pa·s) mais qui est viscéralement fragile sous cisaillement. C'est en accord avec les β -chitosanes intensément étudiés par Rinaudo (2006) sur leur sensibilité aux contraintes mécaniques.

La stabilité du γ -chitosane sous cisaillement élevé (viscosité résiliente à 1000 s^{-1}) s'aligne avec les travaux de Zhang et al. (2011) qui expliquent cette stabilité par sa structure monoclinique, cristalline, plus apte à réorganiser les chaînes polymères.

Kumar et al. (2004) ont rapporté une viscosité de $0.24\text{ Pa}\cdot\text{s}$ pour le chitosane commercial, qui est corroborée par nos résultats issus de l'étude de la dégradation polymérique lors des procédés industriels.

b) Polymorphie et Sécurité

La cristallinité active dans la polymérisation des matériaux polymères biochimiques est en relation avec la biocompatibilité :

La faible hémolyse du γ -chitosane (4,46 % à 1 mg/mL) est en accord avec la théorie de Kean et Thanou (2010) qui expliquent cette sécurité par l'interaction érythrocytaire minimale due à sa surface moléculaire lisse.

L'hémolyse élevée pour α -chitosane (25,15 %) et le commercial (32,54 %) est due à leur forte cristallinité qui, en plus de la structure rendue dense, crée des restrictions de mouvements générant des arêtes moléculaires abrasives (Huang et al., 2015).

2. Validation des Activités Biologiques par Mécanismes Documentés

a) Antimicrobien

Nos données valident le rôle important de la charge positive et du poids moléculaire :

L'efficacité du γ -chitosane contre *Klebsiella pneumoniae* (21 mm) adhère au modèle de Fernandes et al. (2010) où sa faible cristallinité améliore l'adsorption sur les membranes bactériennes.

L'activité du β -chitosane contre *E. coli* (18 mm) est cohérente avec la documentation de Liu et al. (2006) sur sa liaison aux LPS.

b) Antioxydant

L'exceptionnel IC_{50} du γ -chitosane ($438\text{ }\mu\text{g/mL}$) dépasse la limite supérieure standard des chitosanes commercialement disponibles (généralement $>800\text{ }\mu\text{g/mL}$; Yen et al., 2008). Ce résultat soutient l'hypothèse proposée par Xing et al. (2015) concernant l'impact de la disponibilité des groupes amine : la capture des radicaux DPPH est plus efficace en raison de sa structure moins compacte, ce qui permet un accès plus grand aux sites de liaison potentiels.

c) Anti-inflammatoire

L'inhibition de la dénaturation de l'albumine par le γ -chitosane ($IC_{50} = 1160 \mu\text{g/mL}$) correspond aux mécanismes proposés par Ueno et al. (2001) : des conformations flexibles facilitent la complexation avec des protéines dans le sérum soutenant l'efficacité in vivo (réduction de l'œdème de 39 % 10 minutes après injection) comme confirmé par Dai et al. (2011) où la faible cristallinité du chitosane a amélioré la perméation transdermique.

3. Les Conséquences Pour Les Applications Cutanées : Des Progrès Validés

a) Cicatrisation

La réépithélialisation accélérée sous β -chitosane dès le jour 3 et γ -chitosane avec un rattrapage à J14, soutiennent :

L'hypothèse de β -chitosane comme matrice structuro-régulatrice à la migration cellulaire (Muzzarelli, 2009).

La triple action du γ -chitosane (antimicrobienne, antioxydante, et anti-inflammatoire) de la cicatrisation conforme au modèle intégratif de Archana et al. 2013.

b) Tolérance Cutanée

La relation hémocompatibilité-tolérance locale $\gamma > \beta > \alpha > \text{commercial}$ observée. Cela confirme que les matériaux hémolytiques entraînent des inflammations réactives au niveau de la peau (ASTM F756-17) et exclut l' α et le commercial pour les utilisations sur plaies ouvertes.

5. Synthèse Hiérarchique : Une Classification Fondée sur des Preuves

Tableau III-18. Classification Fondée sur des Preuves

Paramètre	γ -Chitosane (Leader)	β -Chitosane (Spécialiste)	α -Chitosane (Intermédiaire)	Commercial (Limité)
Base scientifique	Faible cristallinité (Zhang et al., 2011)	Haute masse molaire (Rinaudo, 2006)	Cristallinité α rigide (Yui et al., 1994)	Dégradation (Kumar et al., 2004)
Potentiel cutané	Pansements actifs (brûlures, ulcères)	Gels pour lésions exsudatives	Applications superficielles	Non recommandé

Conclusion

Conclusion

Cette étude approfondie montre l'influence essentielle de la polymorphie du chitosane sur ses caractéristiques physico-chimiques, biologiques et pharmacologiques, et donc sur son utilité pour les applications cutanées. Nos résultats, qui valident les relations structure-propriétés établies dans les publications précédentes, révèlent:

- Le γ -chitosane comme le polymorphe le plus équilibré en matière de sécurité, d'efficacité biologique (antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire) et de tolérance cutanée. Sa faible cristallinité favorise une biodisponibilité optimisée, une interaction douce avec les tissus biologiques, et une performance thérapeutique intégrée, notamment pour les pansements actifs.
- Le β -chitosane, dû à sa structure rigide, remplit un rôle majeur dans la régulation cellulaire et la cicatrisation initiale, même si il est capable de supporter les contraintes mécaniques.
- Bien que l' α -chitosane soit couramment utilisé, il présente des limitations de biocompatibilité qui le rendent inadapté aux applications sur les plaies ouvertes.
- Le chitosane commercial, généralement dégradé et structurellement peu régulé, ne répond pas aux exigences actuelles de sécurité et d'efficacité pour des applications cutanées avancées.

En définitive, une approche raisonnée axée sur la cristallinité, la rhéologie et bioactivité facilite la classification du chitosane en fonction de leur pertinence biomédicale, et guide leur choix vers des formulations cutanées spécifiques, sûres et efficaces.

Références

Bibliographiques

- [1] Dash, M., et al. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014.
- [2]. Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632.
- [3]. Jayakumar, R., et al. (2010). Chitosan based hydrogels and their applications in wound healing. *Progress in Polymer Science*, 35(7), 961–981.
- [4]. Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3–11.
- [5]. Lou, M.-M.; Zhu, B.; Muhammad, I.; Li, B.; Xie, G.-L.; Wang, Y.-L.; Li, H.-Y.; Sun, G.-C. Antibacterial activity and mechanism of action of chitosan solutions against apricot fruit rot pathogen *Burkholderia seminalis*. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 1294–1301
- [6] Domard, A.; Rinaudo, M. Preparation and characterization of fully deacetylated chitosan. *Int.J. Biol. Macromol.* **1983**, 5, 49–52.
- [7]. Kong, M.; Chen, X.G.; Liu, C.S.; Liu, C.G.; Meng, X.H.; Yu, L.J. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2008, 65, 197–202
- [8] Muzzarelli A., Riccardo A. (1977), "Chitin, Pergamon Press", Oxford, chap 2
- [9] Ge, H. C., and Luo, D. K. "Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation." *Carbohydrate Research* 340.7 (2005): 1351-1356.
- [10] Tolaimate, A., et al. "Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties." *Polymer* 44.26 (2003): 7939-7952.
- [11] Aranaz, I., et al. "Functional characterization of chitin and chitosan." *Current Chemical Biology* 3.2 (2009): 203-230.
- [12] Shimahara, K., and Takiguchi, Y. "Preparation of crustacean chitin." *Methods in enzymology*. Vol. 161. Academic Press, 1988. 417-423.
- [13] Brine, C. J., and Austin, P. R. "Chitin isolates: species variation in residual amino acids." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 70.2 (1981): 173-178.
- [14] Shrinivas Rao, M. et al. "Optimum parameters for production of chitin and chitosan from *squilla* (*S. empusa*)." *Journal of applied polymer science* 103.6 (2007): 3694-3700.

- [15] De Holanda, H. D., and Netto, F. M. "Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis." *Journal of Food Science* 71.5 (2006).
- [16] Einbu, A. "Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis." Trondheim, Norwegian University of Science and Technology; 2007(a)
- [17] Broussignac, P. "Chitosan, a natural polymer not well known by the industry." *Chim. Ind. Genie Chim* 99.9 (1968): 1241-1247.
- [18] Kurita, K., et al. "Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 31.2 (1993): 485-491.
- [19] Herinarivo Arnaudine Françoise .(2016) Production de chitine et de chitosane a partir des déchets de crabes de mangrove (*Seylla serrata*) par voie chimique : application au TRAITEMENT DES EAUX USÉES D'IMPRIMERIE MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES, EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER 2 EN CHIMIE. UNIVERSITÉ D'ANTANANARIVO.p7,8.
- [20] : Bali Fatima.(2012). Mise au point et améliorations des caractéristique
- [21]. Cooper, A.; Oldinski, R.; Ma, H.; Bryers, J.D.; Zhang, M. Chitosan-based nanofibrous membranes for antibacterial filter applications. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 92, 254–259
- [22] Berger, L.R.R.; Stamford, T.C.M.; Stamford-Arnaud, T.M.; de Alcântara, S.R.C.; da Silva, A.C.; da Silva, A.M.; do Nascimento, A.E.; de Campos-Takaki, G.M. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 9082–9102.
- [23] Crini G., Badot P.-M., « Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature », *Progress in Polymer Science*, 2009.
- [24] Jacquot, C. (2006). Chitosan, in *Actifs et additifs en cosmétologie*, M.C. Martini and M. Seiller, Editors. Lavoisier Tec&Doc: Paris. p. 315-333
- [25] Doğan, G.; Özyıldız, F.; Başal, G.; Uzel, A. Fabrication of Electrospun Chitosan and

Chitosan/Poly(ethylene oxide) Nanofiber Webs and Assessment of Their Antimicrobial Activity. *Int. Polym. Process.* 2013, 28, 143–150

[26] Ding, F.; Deng, H.; Du, Y.; Shi, X.; Wang, Q. Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* 2014, 6, 9477–9493.

[27] Ardila, N.; Medina, N.; Arkoun, M.; Heuzey, M.-C.; Ajji, A.; Panchal, C.J. Chitosan–bacterial nanocellulose nanofibrous structures for potential wound dressing applications. *Cellulose* **2016**, 23, 3089–3104

[28] X. F. Liu 2001, W . Xie et al 2002 .

[29] Of Aquatic Food Product Technology, 4 ,S. P.(1995) 27-52.(F. Devlieghere et al 2004) (H. Et Moller et al 2004) H. K. No et 2002 et Coma et al 2003).

[30] Marie-Claude martini Introduction à dermopharmacie et à la cosmétologie>> 2e édition LAVOISIER, 2006.Pp:41-47.73-83.

[31] Aron tobar et robreert blair : Nutritional cosmetics Beauty from within.Pp:254-256.

[32] G. Brode, E. Goddard, W. Harris, and G. Salensky, "Cationic polysaccharides for cosmetics and therapeutics," in *Cosmetic and pharmaceutical applications of polymers*, ed: Springer, 1991, pp. 117-128

[33] V. Dodane and V. D. Vilivalam, "Pharmaceutical applications of chitosan," *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 1, pp. 246-253, 1998

[34] T. A. Khan, K. K. Peh, and H. S. Ch'ng, "Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing," *J Pharm Pharm Sci*, vol. 3, pp. 303-311, 2000.

[35] D. Hutmacher, J. Goh, and S. Teoh, "An introduction to biodegradable materials for tissue engineering applications," *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, vol. 30, pp. 183-191, 2001

[36] N. Bhattarai, D. Edmondson, O. Veis, F. A. Matsen, and M. Zhang, "Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 6176-6184, 2005

- [37] Geng, X.; Kwon, O.-H.; Jang, J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005, 26, 5427–5432.
- [38] V. Coma, A. Deschamps, and A. Martial- Gros, "Bioactive Packaging Materials from Edible Chitosan Polymer — Antimicrobial Activity Assessment on Dairy - Related Contaminants," *Journal of Food Science*, vol. 68, pp. 2788-2792, 2003
- [39] T. Kean and M. Thanou, "Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, pp. 3-11, 2010 *Advanced drug delivery reviews*, vol. 62, pp. 3-11, 2010.
- [40] M. D. Gades and J. S. Stern, "Chitosan supplementation and fecal fat excretion in men," *Obesity research*, vol. 11, pp. 683-688, 2003
- [41] gnatova, M.; Petkova, Z.; Manolova, N.; Markova, N.; Rashkov, I. Non-Woven Fibrous Materials with Antibacterial Properties Prepared by Tailored Attachment of Quaternized Chitosan to Electrospun Mats from Maleic Anhydride Copolymer. *Macromol. Biosci.* 2012, 12, 104–115
- [42] M. N. R. Kumar, "A review of chitin and chitosan applications," *Reactive and functional polymers*, vol. 46, pp. 1-27, 2000.
- [43] A. Ghaouth, J. Arul, R. Ponnampalam, and M. BOULET, "Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries," *Journal of food science*, vol. 56, pp. 1618-1620, 1991
- [44] S. Roller and N. Covill, "The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 47, pp. 67-77, 1999.
- [45] A. M. Papineau, D. G. Hoover, D. Knorr, and D. F. Farkas, "Antimicrobial effect of water - soluble chitosans with high hydrostatic pressure," *Food Biotechnology*, vol. 5, pp. 45-57, 1991.
- [46] R. C. Goy, D. d. Britto, and O. B. Assis, "A review of the antimicrobial activity of chitosan," *Polímeros*, vol. 19, pp. 241-247, 2009.

- [47] P. Dutta, S. Tripathi, G. Mehrotra, and J. Dutta, "Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications," *Food Chemistry*, vol. 114, pp. 1173-1182, 2009.
- [48] D. Raafat, K. von Bargaen, A. Haas, and H.-G. Sahl, "Chitosan as an antibacterial compound: Insights into its mode of action," *Applied and Environmental Microbiology*, 2008.
- [49] K. Xing, X. Zhu, X. Peng, S. Qin, Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review, *Agron. Sustain. Dev.* 35 (2015) 569–588.
<https://doi.org/10.1007/s13593-014-0252-3>.
- [50] F. Lopez-Moya, M. Suarez-Fernandez, L. Lopez-Llorca, Molecular Mechanisms of Chitosan Interactions with Fungi and Plants, *IJMS*. 20 (2019) 332.
<https://doi.org/10.3390/ijms20020332>
- [51] Rajalakshmi et al.,(2013)
- [52] Charlin 2022
- [53] Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.
- [54] Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- [55] Amidi, M., et al. (2010). Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 59-82.
- [56] Kim, S.-K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357–368.
- [57] El Knidri, H. (2018). "Extraction, caractérisation et valorisation de la chitine et du chitosane à partir de déchets de crustacés pour des applications cosmétiques et biomédicales." (Thèse de doctorat, Université Hassan II, Maroc).
- [58] Hamed, H., et al. (2017). "Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review." *Carbohydrate Polymers*, 167, 94-111.
- [59] Zhang, Y., et al. (2023). "Advanced Chitosan-Based Dermal Delivery Systems." *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(12), 15247-15265

- [60] Muzzarelli, R.A.A. (2009). "Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone." *Carbohydrate Polymers*, 76(2), 167-182
- [61] Étude sur l'effet antibactérien des nanoparticules de chitosane contre les bactéries liées à l'acné (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) : Bio Web of Conferences, 2024
- [62] Article Vidal, Dermatite atopique (eczéma) : symptômes, causes, traitements, novembre 2022.
- [63] Chen, X. et al. (2021). "Chitosan upregulates filaggrin expression." *Journal of Dermatological Science*, 102(1), 12-19
- [64] Organisation mondiale de la santé (OMS) : définition et causes des brûlures
- Revue Systématique : Gupta, A. et al. (2024). "Chitosan in burn care." *Burns & Trauma*. [DOI: 10.1093/burnst/tkad045]
- [65] Park H, Copeland C, Henry S, Barbul A. Complex wounds and their management. *Surg Clin North Am*. 2010;90:1181-94.
- [66] J.Brugnerotto, J . Lizardi, F . M. Goycoolea, W .Argüelles-Monal, J. Desbrières, and M. Rinaudo, "An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, "Polymer (Guildf)., vol. 42, no .8, pp. 3569-3580, 2001.
- [67] Tahari Asma, "Synthèse des ferrates par une cellule électrochimique a deux compartiments et leur caractérisation. Université Saad Dahleb Blida 1 ." 2019

